АКАДЕМИЯ НАУК СОЮЗА ССР

МИКРОБИОЛОГИЯ

MICROBIOLOGY

ЖУРНАЛ ОБЩЕЙ, СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННОЙ
И ПРОМЫШЛЕННОЙ МИКРОБИОЛОГИИ

ТОМ XIII. ВЫП. 5

ИЗДАТЕЛЬСТВО АКАДЕМИИ НАУК СССР
МОСКВА

1944

МИКРОБИОЛОГИЯ

Ответственный редактор чл.-корр. Академии Наук СССР Б. Л. Исаченко

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ:

А. Ф. Войткевич, А. А. Имшенецкий,

Я. И. Раутенштейн, В. Л. Рыжков, В. О. Таусон,

Ф. М. Чистяков, В. Н. Шапошников

MICROBIOLOGY

EDITOPIAL BOARD:

A. F. Woitkewich, A. A. Imšenecki,

B. L. Issatchenko (Editor), J. I. Rautenstein,

V. L. Rischkow, W. O. Tausson, F. M. Tchistiakov,

W. N. Schaposchnikov

Адрес редакции: Москва, 71, Б. Калужская, 33,
Институт микробиологии Академии Наук СССР

Президенту Академии Наук СССР

Академику

ВЛАДИМИРУ ЛЕОНТЬЕВИЧУ

КОМАРОВУ

Глубокоуважаемый

Владимир Леонтьевич!

РЕДКОЛЛЕГИЯ ЖУРНАЛА «МИКРОБИОЛОГИЯ» ГОРЯЧО ПРИВЕТСТВУЕТ ВАС В ДЕНЬ ВАШЕГО 75-ЛЕТИЯ И ЖЕЛАЕТ ВАМ СИЛ И ЗДОРОВЬЯ ДЛЯ ПРОДОЛЖЕНИЯ ТВОРЧЕСКОЙ РАБОТЫ НА БЛАГО НАШЕЙ РОДИНЫ.

РЕДКОЛЛЕГИЯ

Printed in Soviet Union

ВЛИЯНИЕ РАСТИТЕЛЬНОГО ПОКРОВА НА МИКРОБНЫЙ СОСТАВ В ПОЧВЕ

Н. А. Красильников

Ризосфера и ее население

Количественный состав микрофлоры в почве определяется разными экологическими факторами, и прежде всего свойствами самой почвы. В развитии микроорганизмов наибольшее значение придается наличию в почве органических веществ, кислотности, аэрации, температуре и другим физико-химическим факторам.

Растения, как фактор накопления микроорганизмов в почве, при исследовании микробного состава обычно не учитывались. Вместе с тем растения, как видно из работ последнего времени, оказывают большое влияние на развитие, отбор и накопление микроорганизмов в почве.

Растения при жизни выделяют через корневую систему различные органические вещества — сахара, органические кислоты, аминокислоты, затем они выделяют ряд неорганических веществ.

По наблюдению Lyon и Wilson [18], общее количество органических веществ, выделяемых корнями за весь вегетационный период, составляет 5% от сухого веса ассимилированной массы. Mazé [19] нашел, что один экземпляр кукурузы в стерильном питательном растворе выделяет за 20 дней 57 мг сахара и 84 мг органических кислот. По определению Шулова [12] корни того же растения выделяют за 2 мес. 94 мг сахара и 80,6 мг яблочной кислоты, а корни гороха за тот же период — 140 мг сахара. В сменяющихся растворах корни кукурузы выделяют органических веществ на 140%, а корни табака — на 170% больше, чем в бессменных растворах (Демиденко [3]). Мошковцев [11] нашел, что корни риса за 11 дней выделяют органических веществ 20—30% от всей выделяемой массы. В корневых выделениях он нашел сахар, альдегид, этиловый спирт и т. п. Stoklasa [22] находил в корневых выделениях органические кислоты (уксусную, муравьиную). Наличие органических веществ в корневых выделениях растений определяют многие авторы (Schreiner [25], Truffaut et Bessonoff [24]).

По нашим наблюдениям [1], корни кукурузы за 20 дней выделяют 120 мг, а корни пшеницы — 67 мг органических веществ, легко усвояемых микробами [2].

Разные растения выделяют различные органические вещества. У бобовых обнаруживается больше аминокислот и других азотистых соединений (Virtanen [26]), у злаков находят преимущественно сахара и органические кислоты. По наблюдению Groh [16], горох, конские бобы и люпин выделяют вещества, имеющие кислую реакцию, а овес, рожь, ячмень, горчица — нейтральную или щелочную.

---

[1] Из неопубликованных данных.

[2] Корневые выделения определялись биологическим методом, по количеству развившихся клеток микробов. Метод описан в 1934 г. [7].

Все эти соединения являются прекрасным источником питания для микроорганизмов почвы.

По наблюдению Ахромейко [1], бобовые и некоторые масляничные растения отличаются от других растений (злаков) тем, что выделяют большое количество фосфорной кислоты.

Кроме указанных выделений растения непрерывно сбрасывают с поверхности корней отмершие клетки эпидермиса и корневые волоски, которые также являются хорошим источником питания.

Корни, выделяя органические вещества, образуют вокруг корней отличную от обычной почвы среду, способствуя тем скоплению вокруг них микроорганизмов. Здесь реакция почвы усредняется: в кислых почвах pH становится выше, приближаясь к pH = 7; в щелочных показатель pH снижается (Thom u. Humfeld [23]). Влажность, структура почвы и аэрация в зоне корней сохраняются на более оптимальной высоте (Красильников [8], Дорман [4]). Имеются данные, говорящие о том, что вокруг корней накопляется значительное количество ростовых веществ, благоприятно действующих на жизнедеятельность микроорганизмов (Jakes [13], Красильников [8]).

Все это указывает на то, что в зоне корней создаются особые, наиболее благоприятные условия для развития и жизнедеятельности микроорганизмов. Эта зона называется р и з о с ф е р о й.

Исследования показывают, что в ризосфере микронаселение многочисленнее, чем в почве вне корневой зоны. Впервые на это обратил внимание Hiltner [17]. Исследования различных авторов (Starkey, Greaves, Poschenrieder [20], Исакова [5], Березова [2]) подтвердили и уточнили наблюдения Hiltner'a.

Современные исследования показывают, что число микроорганизмов в зоне корней в сотни и тысячи раз больше, чем в почве вне корневой системы (см. Красильников, Рыбалкина [9]).

По нашим наблюдениям, в 1 г прикорневой почвы насчитывается от 100 млн. до 100 млрд. клеток. Количество их колеблется в зависимости от почвенного режима, климатических условий и от вида растений. В южных почвах (серозем Вахшской долины) в ризосфере люцерны мы насчитывали до 100 млрд. клеток бактерий в 1 г почвы, а в каштановых почвах Заволжья в ризосфере того же растения — не более 10 млрд.

Чем ближе почва примыкает к поверхности корней, тем больше она содержит микроорганизмов. Наиболее богатый, почти насыщенный слой почвы, толщиной в 2 мм, примыкающий к поверхности корней, мы называем б и о л о г и ч е с к и д е я т е л ь н ы м с л о е м.

Видовой состав прикорневой микрофлоры не очень разнообразен. Преобладающее большинство ее составляют неспороносные бактерии: примерно 99,5% от всей микрофлоры, определяемой современными методами исследования, относятся к указанной группе; остальные 0,5% падают на спороносные бактерии, актиномицеты и грибы.

В отдельных случаях неспороносные бактерии почти полностью заполняют биологически деятельный слой,— кроме них ничего другого в нем не удается обнаружить. В период созревания и отмирания растения количественное соотношение этих организмов меняется (Красильников [9]). Из неспороносных бактерий в ризосфере обнаруживаются: азотобактер, клубеньковые бактерии, миколитические бактерии, денитрификаторы, нитрификаторы и др.

Приведенный состав прикорневой микрофлоры не является строго постоянным. Количественное и качественное соотношения его меняются в зависимости от вида растений, о чем будет речь в следующем разделе.

Специфика прикорневой микрофлоры

Уже по одному тому, что у разных растений корневые выделения различны по своему составу и по количеству, можно полагать, что и состав микрофлоры у них различен. Биологические особенности отдельных растений накладывают свой отпечаток на весь характер прикорневой жизни.

В 1934 г. опытами со стерильными культурами растений нами установлено, что пшеница и кукуруза различно действуют на разные виды почвенных микроорганизмов. Азотобактер, например, в среде с корневыми выделениями пшеницы быстро погибает, тогда как в среде с корневыми выделениями кукурузы он не только не погибает, но даже несколько развивается. В более поздних исследованиях Кореняко подтвердила эти наблюдения и значительно их расширила [1]. По ее данным, корневые выделения пшеницы, кукурузы, льна и некоторых других растений угнетают или полностью приостанавливают рост и развитие азотобактера; корневые выделения клевера, люцерны, гороха, наоборот, способствуют его развитию (табл. 1).

Таблица 1

Развитие бактерий в среде с корневыми выделениями разных растений. Число клеток (в тыс.) в 1 см³ среды на 20-е сутки роста растений

Корневые выделения растений	Клубеньковые бактерии	Азотобактер	Pseudomonas fluorescens шт. 1	Pseudomonas fluorescens шт. 2
Пшеницы	10	0	200 000	1 000
Кукурузы	0,1	0,01	15 000	4 000
Хлопчатника	100 000		100 000	30 000
Свеклы	—	1,5	100	100 000
Льна	0,1	0,01	300	1 000
Клевера	1 000 0 0	6 000	1 000	10 000 000
Люцерны	100 000	5 000	1 000	10 000 00

Такое же различное действие корневых выделений растений наблюдается и на развитии клубеньковых бактерий. Последние не развиваются в присутствии пшеницы, кукурузы, льна, но хорошо развиваются в присутствии хлопчатника, клевера и люцерны.

Два штамма неспороносных бактерий Pseudomonas fluorenscens 1 и 2 по-разному реагировали на корневые выделения тех же растений. Штамм 1 предпочтительнее развивался в присутствии пшеницы, кукурузы и особенно хлопчатника, а штамм 2 — значительно лучше в присутствии клевера и люцерны.

Кроме упомянутых бактерий мы выращивали ряд других — спороносных и неспороносных, а также микобактерии и дрожжи. Спороносные бактерии B. mycoides, B. mesentericus, B. megatherium, как правило, в средах с корневыми выделениями не развивались, но и не погибали. Микобактерии развивались слабо, дрожжи — хорошо, особенно в субстрате, где росли пшеница и кукуруза.

Аналогичные результаты получены нами в опытах с нестерильными культурами растений. Семена тех же растений бактеризовались чистыми культурами бактерий или смесью их и высевались в почву в вегетационных сосудах. Через определенные сроки производился учет их развития в ризосфере.

Для основных опытов были взяты 4 вида бактерий: азотобактер (Az. chroococcum), клубеньковые бактерии люцерны и два штамма не-

[1] Методы исследования описаны Кореняко в журнале Микробиология т. XI, вып. 3, стр. 105, 1942.

спороносных бактерий Pseudomonas fluorescens и Pseudomonas aurantiaca. В отдельных опытах испытывались также B. herbicola, Rh. trifolii и Achromobacter шт. 1 и 4, затем миколитические бактерии (Pseudomonas fluorescens шт. 8), растворяющие грибок Fusarium.

Степень развития бактерий в основных опытах представлена в виде кривых на рис. 1, причем взяты только данные двух растений — люцерны и пшеницы, как наиболее показательные. В остальных случаях кривые роста бактерий меняются в ту или другую сторону, в зависимости от вида растений. Азотобактер развивается в прикорневой почве клевера, люцерны, гороха; не развивается, и даже погибает, в зоне корней пшеницы, кукурузы, льна, хлопчатника. Клубеньковые бактерии очень быстро размножаются в ризосфере бобовых и хлопчатника, не развиваются в ризосфере льна, кукурузы и пшеницы. Из неспороносных бактерий одни штаммы сильнее развиваются в ризосфере злаков, другие — у бобовых или хлопчатника и льна. B. herbicola быстро погибает под пшеницей, сохраняется долго, или даже развивается, в ризосфере клевера. Миколитические бактерии (Ps. fluorescens шт. 8) обильно размножаются под клевером и не развиваются под пшеницей. B. herbicola быстро исчезает из ризосферы пшеницы, овса, ячменя, льна; долго сохраняется и даже слегка развивается в ризосфере клевера, гороха и люцерны.

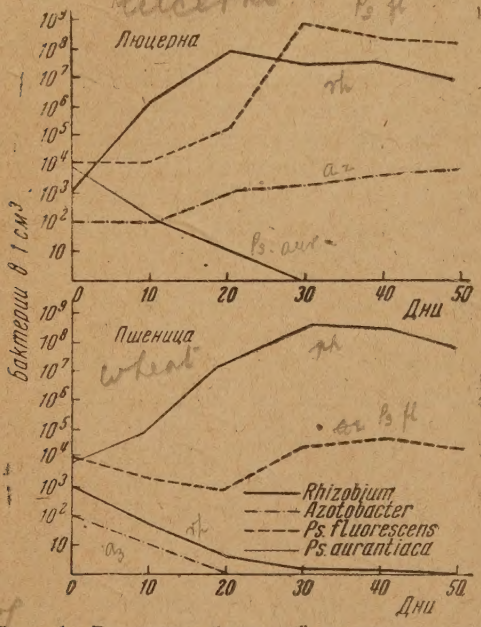

Рис. 1. Развитие бактерий в питательном растворе со стерильными культурами растений

Приведенные данные получены нами в опытах на подзолистых почвах.

В других почвах влияние растений на развитие бактерии может быть иное. Известно, что состав почвы оказывает весьма большое влияние на рост и развитие бактерий. Многие почвы для некоторых видов микроорганизмов являются токсичными, и устранить эту токсичность растения если и могут, то не всегда. Исходя из этого, мы провели серию опытов на подзоле, черноземе, сероземе и каштановых почвах. Мы выращивали на этих почвах в вегетационных сосудах клевер, горох, лен, пшеницу, пробактеризованные азотобактером.

Результаты приведены в табл. 2.

Как видно из таблицы, азотобактер развивается в зоне корней одного и того же растения в разной степени, в зависимости от почвы. Неблагоприятное действие пшеницы в значительной степени снижается или даже совсем не проявляется в черноземе, сероземе и каштановых почвах. Даже в ризосфере льна на тех же почвах азотобактер обнаруживается длительное время.

Оказывая существенное влияние на микрофлору, почва, тем не менее, не устраняет специфики корневых выделений растений. Последние по-разному влияют на микроорганизмы почвы. А если это так, то надо ожидать, что в естественных условиях в самой природе видовой состав

Таблица 2

Развитие азотобактера в ризосфере растений в разных почвах. Число клеток в 1 г прикорневой почвы, в разные сроки роста растений

Почвы \ Возраст растений	Горох			Пшеница			Лен		
	15	30	60	15	30	60	15	30	60 суток
Подзол московский . .	500	0	0	30	0	0	0	0	0
Чернозем курский . .	15 000	25 000	40 000	5 000	5 000	3 000	300	150	10
Серозем Средн. Азии .	25 000	30 000	60 000	1 500	1 000	500	50	0	0
Каштановые почвы Заволжья	4 000	8 000	5 000	2 000	3 000	1 500	100	10	0

растительного покрова оказывает большое влияние на микробный отбор в почве.

Развитие микрофлоры в почве под влиянием растительного покрова

Изложенный выше материал послужил нам основанием для дальнейших наблюдений над развитием микроорганизмов в почве в естественных условиях. Если растения оказывают в природной обстановке такое же действие на состав микрофлоры в ризосфере, как и в вышеописанных экспериментах, то, естественно, следует ожидать определенных закономерностей в распределении и накоплении отдельных видов микроорганизмов и образовании целых микробных популяций, более или менее специализированных и приспособленных к растительному покрову.

Полевые наблюдения и специальные полевые опыты проводились нами на протяжении нескольких лет. Были обследованы разные типы почв, с разными растениями и в разных районах Советского Союза. Основные исследования велись на окультуренных полях, занятых культурными растениями. Основное внимание уделялось полям с многолетней монокультурой. Имелось при этом в виду, что при длительном накоплении определенных форм микроорганизмов под влиянием одного и того же вида растений легче установить различия и специфику в видовом составе микрофлоры.

В своих исследованиях мы учитывали только те виды микроорганизмов, которые легко распознаются и методы учета которых наиболее разработаны. Мы определяли развитие азотобактера, клубеньковых бактерий, миколитических бактерий, растворяющих грибки Fusarium и Verticilium dahliae, затем денитрификаторов и целлюлозных бактерий. В некоторых случаях определяли развитие в ризосфере нитрификаторов, маслянокислых бактерий и бактерий восстановителей вообще.

В полевых опытах велись наблюдения над развитием в ризосфере бактерий, внесенных с семенами. Семена растений перед посевом бактеризовались азотобактером, клубеньковыми бактериями и одним штаммом Ps. aurantiaca, легко распознаваемым по культуральным признакам. Затем по срокам брались и анализировались образцы прикорневой почвы.

Результаты всех этих наблюдений и исследований показывают, что хотя в естественных условиях влияние растений и менее четкое, чем в лабораторной обстановке, все же оно вполне реальное и легко поддается учету.

В естественных условиях, на полях и лугах мы наблюдали ту же зависимость развития микроорганизмов от растений.

Наиболее показательные результаты были получены с азотобактером, клубеньковыми и миколитическими бактериями.

По отношению к первому микробу растения можно разделить на три группы. К первой группе относятся те растения, которые способ-

ствуют развитию и накоплению азотобактера в почве. Сюда мы относим, например, люцерну, донник, клевер, горох, рис, райграс и ежу. Под этими растениями насчитывается десятки тысяч, а в отдельных случаях даже сотни тысяч азотобактера в 1 г почвы, в зависимости от ее состава и климатических условий того района, где растут растения.

Следует отметить, что у указанных растений азотобактер развивается более интенсивно не на поверхности корней, а на некотором расстоянии от них; это же наблюдал и Пошенридер. По всей вероятности, его вытесняют с поверхности корней неспороносные бактерии своей массой.

К другой группе мы причисляем растения, которые не стимулируют заметно, но и не угнетают развитие азотобактера. Сюда следует отнести ячмень, овес, подсолнечник, картофель, томаты, табак, свеклу. Под этими растениями количество азотобактера в почве не увеличивается, а если и увеличивается, то слабо. Больших скоплений его мы не обнаруживали. В наиболее благоприятных условиях, как например, в черноземе (около Харькова) или на огородных почвах под этими растениями мы насчитывали азотобактера в количестве не более 5 000, а чаще 2 000—3 000 в 1 г.

В почвах, где азотобактера вообще нет, растения второй группы не изменяют положения,— они не вызовут его появления, даже в тех случаях, когда почвы нетоксичны.

Если эти растения пробактеризовать культурой азотобактера, внести его в почву извне, вместе с семенами, то при благоприятных почвенных условиях он будет развиваться, но в ограниченном числе.

К третьей группе мы относим растения, подавляющие развитие азотобактера. В нее входят: пшеница, кукуруза, лен, хлопчатник. Под этими растениями азотобактер либо совсем не обнаруживается, либо обнаруживается в небольшом количестве (табл. 3). Угнетающее действие этих растений особенно сильно проявляется на бедных органическим веществом почвах. В подзоле Московской и других областей средней полосы, как правило, азотобактер не обнаруживается в ризосфере пшеницы и льна. Если его внести извне, он быстро погибнет; иногда он не обнаруживается уже на 5—10-е сутки после внесения в почву с семенами.

В других почвах — в каштановых, сероземе, в условиях Средней Азии и Заволжья эти же растения не проявляют такого угнетающего действия на рост азотобактера. Последний обнаруживается в большем или меньшем количестве не только в средних образцах участка, но даже в зоне корней. Однако относительное число его всегда меньше под этими растениями, чем под растениями первых двух групп. Внесение азотобактера с семенами растений третьей группы в серозем и каштановые почвы не увеличивает его численности в ризосфере.

Приведенное подразделение следует считать схемой. Специфичность, выражающаяся в преимущественном развитии азотобактера в ризосфере определенных растений, относительна. В зависимости от почвенных и климатических условий одно и то же растение может действовать на рост азотобактера то как растение 3-й группы, то как растение 2-й группы, а в отдельных случаях даже слегка стимулирует. Только на одном и том же почвенном фоне и при одних и тех же внешних условиях проявляется специфическое влияние растений на указанный организм. Особенно показательно это влияние в монокультурах. В севообороте люцерна — хлопчатник, в условиях Средней Азии, мы наблюдали резкую смену. Под люцерной количество азотобактера с каждым годом увеличивалось, а под хлопчатником, засеянном по люцер-

не, происходило заметное его уменьшение (рис. 2). На третьем году под люцерной было предельно максимальное, а под хлопчатником предельно минимальное количество азотобактера.

Рис. 2. Развитие азотобактера в почве при севообороте люцерна—хлопчатник

На четвертом, пятом и даже седьмом году культивирования хлопчатника (старопашка) дальнейшее падение азотобактера в почве не наблюдается. Устанавливается предел, ниже которого число бактерий в почве вообще не падает.

Таблица 3

Накопление азотобактера в почве под влиянием растений. Число клеток в 1 г почвы

Почва и район	Растения	Число азотобактера под культурой	Число азотобактера под паром	Почва и район	Растения	Число азотобактера под культурой	Число азотобактера под паром
Подзол (Московская обл.)	Пшеница	0	60	Серозем (Кирг. ССР и Узб. ССР)	Пшеница	20	100
	Рожь	0	100		Кукуруза	50	120
	Ячмень	50	60		Люцерна	3500	150
	Овес	70	50		Свекла	300	200
	Картофель	60	60		Картофель	180	150
	Клевер	1000	80		Хлопчатник	10	250
	Горох	800	60	Каштановые почвы (Заволжье)	Пшеница	0	0
	Люцерна	1200	50		Просо	0	0
	Лен	0	80		Подсолнечник	40	50
Чернозем (Куйбышевская обл.)	Пшеница	80	200		Кукуруза	0	0
	Ячмень	350	300		Люцерна	2000	40
	Люцерна	3000	300		Донник	1500	50
Серозем (Вахшская долина)	Люцерна	10000	800	Крымские почвы	Табак	250	200
	Хлопчат.	100	550		Виноград	150	180
	Райграс	6000	400	Краснозем (Кавказ)	Люцерна	1500	80
	Ежа	3000	400		Табак	100	80
	Рис	8000	500		Виноград	10	30

Клубеньковые бактерии обильно развиваются в почвах, занятых бобовыми растениями. Количество их определяется от 100 тыс. до 10 млрд. и более в 1 г почвы.

Имеются небобовые растения, которые также способствуют развитию этих организмов. По нашим наблюдениям, к таким растениям относятся хлопчатник, райграс и тимофеевка. Под первыми двумя растениями в условиях Средней Азии клубеньковых бактерий люцерны мы насчитывали сотни тысяч в 1 г почвы, почти столько же, сколько и под люцерной. Под тимофеевкой почва накопляет этих бактерий десятки тысяч в условиях Заволжья.

Другие из обследованных нами небобовых растений снижают число

клубеньковых бактерий в том случае, если они следовали за бобовыми, причем снижение это различно в разных почвах и под разными растениями. Лен и пшеница наиболее сильно подавляют развитие клубеньковых бактерий клевера в подзолистых почвах Московской области. На рис. 3 представлены кривые развития этих бактерий в почве одного и того же участка, находившегося под клевером 3 года, под пшеницей

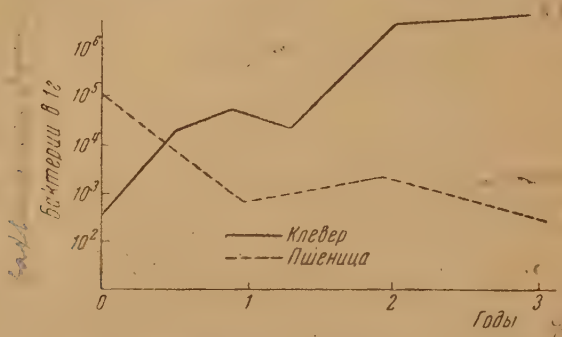

Рис. 3. Развитие Rhizobium trifolium под клевером и злаками

(по клеверу) и под овсом. Уже к концу 1-го года вегетации пшеницы клубеньковые бактерии резко упали в числе; под овсом, засеянным после пшеницы, не обнаружено тенденции дальнейшего снижения, даже имеется небольшой подъем к концу летнего сезона.

Из неспороносных бактерий привлекают внимание миколитические бактерии и денитрификаторы. Первые обильно развиваются в почве под люцерной и клевером и совсем не развиваются под хлопчатником и льном.

По наблюдению Кореняко, миколитические бактерии, растворяющие грибок Verticillium dahliae накопляются к концу летнего сезона под люцерной в значительном количестве (от 100 до 1 000 тыс. в 1 г), максимум их накопления обнаруживается на 3-м году роста люцерны. Под хлопчатником число их падает с каждым годом (рис. 4). Кривая роста примерно такая же, как и у азотобактера.

Рис. 4. Миколитические бактерии под люцерной и хлопчатником (Ср. Азия)

Миколитические бактерии, разрушающие грибок Fusarium, обнаруживались нами в средней полосе преимущественно в почвах из-под клевера, много их под огородными культурами.

Бактерии, восстанавливающие нитраты, обнаруживаются в большом количестве в ризосфере всех растений; под люцерной несколько больше, чем под хлопчатником или кукурузой; под клевером больше, чем под пшеницей.

Изучая видовые особенности денитрификаторов, выделенных из ризосферы люцерны, пшеницы и проса (Ершовский стационар Саратовской обл.), нам удалось установить, что они отличаются друг от друга. Штаммы, выделенные из-под пшеницы, более активны, чем штаммы, выделенные из ризосферы люцерны и проса. Они заканчивают процесс восстановления нитритов на 3—5-е сутки, тогда как штаммы люцерны и, особенно, проса — на 5—10-е сутки. В первом случае процесс сопровождается бурным выделением газа, во втором газообразования нет или оно очень слабое.

Среди других видов неспороносных бактерий, обильно развивающихся в ризосфере растений, надо полагать, также существует различие в способности приживаться к определенным видам растений. К сожалению, мы не имеем достаточно тонких методов распознавания и дифференцировки этой группы бактерий, чтобы можно было уловить эти различия.

Растения, как видно из приведенных наблюдений, являются мощным фактором отбора и накопления почвенных микроорганизмов. Благодаря корневым выделениям, а также продуктам распада отмерших корневых волосков и самих корней они привлекают громадное количество микроорганизмов,— при этом не только привлекают, но и отбирают. В зоне корней развиваются только те виды, которые более быстро ассимилируют корневые выделения, легко там размножаются, завоевывают себе место в борьбе за существование и доминируют там.

У разных видов растений эти доминанты более или менее различные. Почвенные микроорганизмы приспосабливаются не только к почве как субстрату, но и к растению. При длительном культивировании растений в почве происходит вследствие этого односторонний отбор и накопление определенных видов микроорганизмов. Такой отбор часто ведет к накоплению нежелательных видов, возбудителей различных заболеваний у растений. При нарушении агротехнических правил, при неправильном подборе растений в севообороте поля засоряются вредной микрофлорой. Засорение это может быть вследствие того, что фитопатогенные организмы привлекаются корневой системой или вследствие исчезновения из почвы микробов антагонистов.

Многие вспышки эпифитий,— как, например, фузариоз у злаков, хлопчатника, у сеянцев древесных пород и также вилт и гомоз хлопчатника,— по нашему мнению, обусловлены указанным отбором. Хлопчатник при бессменном культивировании на одной и той же почве в течение многих лет способствует накоплению микробов — возбудителей вилта и гомоза. Наши исследования показали, что в этих почвах исчезают бактерии, поражающие грибок V. dahliae — возбудитель вилта. Египетский хлопчатник, видимо, способствует развитию в почве грибка Fusarium, вызывающего фузариоз его.

Практика сельского хозяйства с древних времен использует севооборот как способ повышения урожая. Было эмпирически установлено, что при севообороте заболевания растений уменьшаются. В борьбе с вилтом хлопчатника севооборот считается пока единственным эффективным способом. Люцерна чередуется с хлопчатником. В этом севообороте люцерна, как видно из предыдущего, накопляет в почве много миколитических бактерий, растворяющих указанный выше грибок.

Положительная роль растительного покрова заключается не только в накоплении в почве антагонистов, вытесняющих фитопатогенных микробов. Массовое накопление азотфиксаторов, бактерий-активаторов, стимулирующих рост и развитие растений, повышают плодородие почв. Одни обогащают почву азотом, другие непосредственно действуют на растения гормонами, третьи вообще улучшают химические и физи-

ческие свойства почвы, на что было указано выше. По исследованию Greaves a. Bracken [15], почва из-под люцерны фиксирует азота больше, чем почва из-под злаков и парующая. По нашим подсчетам, азотобактер в найденном количестве под 2—3-летней люцерной в Вахшской долине (Таджикской ССР) может фиксировать 30—50 кг азота на гектар за летний сезон (270 дней), а под хлопчатником только 3—5 г.

В естественных условиях — в природе, нетронутой человеком, селекционирующая роль растительного покрова наглядно проявляется в лесах.

Всем хорошо известно, что съедобные грибы растут в определенных растительных сообществах. Подосинники, как правило, встречаются среди осин, белые грибы в тех местах не встречаются. Среди берез растут черные грибы одной разновидности, а среди лозняка — другой. Подсосенники и маслята можно найти только в хвойных лесах.

Древесные породы уже с первых лет своего роста заметно меняют состав микрофлоры в почве. Нами были обследованы питомники плодоовощной станции Киргизии. Среди них были главным образом ясень, клен, ива, акация. На четвертом году жизни первые три вида устранили азотобактер из почвы полностью, а акация, наоборот, способствовала его развитию. Из плодовых деревьев благоприятное влияние на азотобактер оказывает груша, тогда как яблони и косточковые устраняют его.

На целинных почвах растительный покров по видовому составу довольно разнообразен. Следовательно влияние его на микрофлору почвы менее выражено, чем влияние культурных растений в окультуренных почвах. Здесь не сказывается влияние какого-либо одного вида растения,— действие растительного сообщества суммарное. Влияние отдельных сообществ или ценозов на отбор и накопление безусловно имеется, однако пути изучения этого влияния, видимо, иные, чем в вышеописанных исследованиях.

Институт микробиологии
Академии Наук СССР
Москва

Получено 6.III.1944

ЛИТЕРАТУРА

1. Ахромейко А. О выделении корнями растений минимальных веществ. Изв. АН, сер. биологич., № 1, стр. 215, 1936.
2. Березова Е. О роли Bac. amylobacter в развитии льна. Микробиология, т. IX, вып. 9—10, стр. 813, 1940.
3. Демиденко Т. Из области питания и обмена веществ у высших растений. Изв. С.-х. Акад. им. Тимирязева, № 3, стр. 133, 1929 и Агрон. журн., № 7—8, стр. 528, 1928.
4. Дорман И. Агрономические основы хлопковых севооборотов поливных районов Средней Азии. Сов. агрон., № 7, стр. 3, 1939.
5. Исакова А. К вопросу о воздействии бактериориз на растения и о его сущности. Тр. Ин-та физ. раст. АН СССР, т. 2, стр. 5, 1937.
6. Кореняко А. Влияние корневых выделений растений на развитие клубеньковых бактерий. Микробиология, т. XI, вып. 3, стр. 105, 1940.
7. Красильников Н. Влияние корневых выделений на развитие азотобактера и других почвенных микробов. Микробиология, т. III, вып. 3, стр. 340, 1934.
8. Красильников Н. О микробиологических процессах в ризосфере растений. Проблемы сов. почвоведения. Сб. № 11, стр. 159, 1940.
9. Красильников Н., Рыбалкина А., Габриэлян и Кондратьева Т. К микробиологической характеристике почв Заволжья. Тр. Комиссии по ирригации АН СССР, т. I, вып. 3, 1934.
10. Красильников Н., Крисс А. и Литвинов М. Микробиологическая характеристика ризосферы культурных растений. Микробиология, т. V, стр. 87, 1936.
11. Мошковцев М. Материалы к познанию изреживания всходов риса (корневые выделения рисовых проростков и их влияние на биодинамику почв). Тр. Центр. оп. ст. НКЗ СССР, вып. 1, 1934.

12. Шулов И. Исследования в области физиологии питания высших растений при помощи методов изолированного питания и стерильных культур, Москва, 1913.
13. Jakes E. Nové poznatky o vztazich mezi rostlinami a mikroby. Csl. Zemid 20, S. 15, 1938. Реф. Cbl. Bakter. Bd. 99, S. 346, 1938.
14. Gräf G. Ueber den Einfluss des Pflanzenwachstums auf die Bakterien im Wurzelbereich. Cbl. Bakt., Bd. 82, S. 44, 1928.
15. Greaves J. a. Bracken A. The influence of cropping on the nitrogen fixing power of soil. Soil. Sci., 3. 47, p. 201, 1939.
16. Groh. Ueber Reaktionen der Wurzelsäfte einzelner Pflanzen und die Beeinflussung der Reaktion verschiedener Nährsalze durch die Pflanzen. Landw. Jahrb, Bd. 36, S. 483, 1926.
17. Hiltner L. Arbeit. Dtsch. Landw. Ges. 98, S. 358, 1904. Реф. Cbl. Bakter. 14, 400, 1904.
18. Lyon T. a. Wilson J. Liberation of organic matter by roots of growing plants Agric. Exper. Sta. Mem., No. 40, 1921.
19. Mazè P. Recherches sur la physiologie végétable. Ann. Inst. Pasteur, t. 25, p. 705, 1911.
20. Poschenrieder H. Ueber die Verbreitung des Azotobakter im Wurzelbereiche der Pflanzen. Cbl. Bakter., Bd. 80, S. 369., 1930.
21. Starkey R. Influence of the development of higher plants upon the microorganisms in the soil, v. 45, p. 207, 1938. Реф. Soil Sci., v. 32, p. 367, 1931.
22. Stoklasa J. u. Ernest. Beiträge zur Lösung der Frage der chemischen Natur des Wurzelsekreten. Jahrb. Wiss. Bot., Bd. 46, S. 55, 1910.
23. Thom C. a. Humfeld D. Notes on the association of microorganisms and roots, J. bact., v. 23, p. 79, 1932. Реф. Soil Sci., v. 34, p. 29, 1932.
24. Truffaut G. et Bessonoff N. Fixation de l'azote par des plantes supérieures outres que les légumineuses. La Sci. Sol, t. 4, fig. 1, 1925; t. 5, fig. 1, 1926; t. 6, fig. 1, 1927.
25. Schreiner O. The toxic action of certain organic plant constituents, Bot. Gaz., v. 45, p. 73, 1908.
27. Virtanen A. Excretion of nitrogen in associated cultures of légumes and non-legumes. J. Agric. Sci., v. 27, p. 332, 1937.

MICROFLORA OF SOILS AS INFLUENCED BY PLANTS

N. Krassilnikov

Summary

1. Around the root system of the plant a special regime is established which offers an optimum for the development of microorganisms. Root secretions, falling off root hairs and other decayed root-cells make the soil of the rhizosphere richer in organic substances. Humidity, acidity and other physical-chemical factors in the soil surrounding the roots are nearer to the optimum than in the control soil.

2. The number of microorganisms present in the rhizosphere is tens and hundreds times that of the control soil. According to the soil composition, climatic conditions and other factors, the rhizosphere may contain from 100 million to 100 milliards of microbes per 1 g soil.

3. The microflore of the rhizosphere is rather poor as to its specific composition. No more than 2—3, rarely 4—6 species may usually be observed among the microbes bounding of the root plants. Non-sporulating bacteria are prevalent in all cases, making up about 95,5 per cent to the total number of microbes of the rhizosphere.

4. Both the quantitative and specific composition of the soil microflore are strongly affected by plants. Different species of microbes are found to develop around the roots of different plants. A given bacterial species may thrive in the rhizosphere of some definite plants, whereas it fails to develop in the rhizosphere of others, or even perishes within a short time.

The influence of alfalfa, clover, wheat, maize, flax, cotton, some arborial species etc. upon the development of Azotobacter, of nodule bacteria-

mycolytic bacteria, denitrificing and cellulose decomposing bacteria has thoroughly been investigated.

5. About the root system each species of plants develop a more or less specialized microflore. The special character of the microflore of a given rhizosphere is well pronounced and persists throughout the growing period of the plants, though even they are grown in a similar soil of and under similar climatic conditions.

Though the specific composition of the microbic flore in the rhizosphere of a plant may be affected by the changes taking place in the external conditions of the soil regime, the specific distinctions do nevertheless persist.

6. The vegetable covering plays a very important selective part in the formation of microbic populations in the soil. If a definite crop is grown for a long time on the same plot (monoculture), this results in the selection of definite microbic species in the soil. This circumstance may lead to the contamination of the soil by an injurious and phytopatogenic microflore, which may be presented by including into the crop rotation various plant species.

Institute of Microbiology of the
Academy of Sciences of the USSR
Moscow

ВЛИЯНИЕ КОРНЕВЫХ ВЫДЕЛЕНИЙ КУКУРУЗЫ НА ФИКСАЦИЮ АЗОТА АТМОСФЕРЫ AZOTOBACTER CHROOCOCCUM В УСЛОВИЯХ МОНОБАКТЕРИАЛЬНОЙ КУЛЬТУРЫ

М. В. Федоров

Влияние корневых выделений высших растений на продуктивность фиксации азота атмосферы изучалось многими исследователями. Некоторые из них (Truffaut и Bessonoff [25], Костычев [10, 11]) придавали этому источнику органического вещества столь существенное значение, что считали излишним дополнительное снабжение азотфиксирующих бактерий углеродистой пищей. Однако последующие исследования не подтвердили этой оптимистической оценки.

Анализируя любой фитоценоз, легко убедиться, что корневая система растений находится в постоянном соприкосновении с почвенной микрофлорой. Поэтому легко предположить, что между растениями и микроорганизмами должны существовать исторически сложившиеся и, видимо, тесные взаимоотношения. Они могут носить весьма разнородный характер, но пока еще изучены довольно слабо, за исключением взаимоотношений между клубеньковыми бактериями и бобовыми растениями. По отношению к другим растениям и другим микроорганизмам это менее ясно, хотя определенные взаимоотношения между ними несомненно существуют. Еще первые опыты Caron'a [20] с прививкой бактериальных культур к злаковым растениям показали, что иногда такая прививка оказывает весьма благоприятное влияние.

Весьма определенные различия в количестве бактерий, растущих в ризосфере растений и в контрольной почве, были констатированы Красильниковым [14, 15]. Довольно часто число бактерий в ризосфере корня кукурузы, подсолнечника и сои было в 5—10 раз больше, чем в контрольной почве. Автор проследил динамику изменений по периодам роста растений и во всех случаях установил одну и ту же закономерность: число бактерий в ризосфере в несколько раз больше, чем в контрольной почве в любой период развития растений. Сравнивая между собой различные периоды, он мог установить два максимума в развитии бактерий ризосферы. Первый максимум приходится на период стеблевания у пшеницы и период образования пасынков у кукурузы. Второй максимум совпадает с плодоношением. По данным Исаковой [8, 9], взаимоотношения между почвенными микроорганизмами и высшими растениями возникают с первых же моментов попадания семян в почву.

Заметное влияние оказывает корневая система высших растений и на распространение азотобактера в почве. Hiltner'у [22] удалось установить, что в прикорневой зоне крестоцветных могут легко обнаруживаться клетки азотобактера, способствующие усвоению этими растениями азота атмосферы. Близкие результаты были получены и другими авторами, исследовавшими распространение азотобактера в различных почвах. По их данным, наиболее широкое распространение азотобактера приходится на почвы, занятые крестоцветными, значительно меньше — на луговые и лесные почвы, занятые другими культурами растений.

По наблюдениям Abbot [19], азотобактер часто встречается также на корнях сахарного тростника, а по данным Костычева [11, 12], он

очень широко распространен в почвах, занятых культурой табака (более 10 млн. клеток на 1 г почвы). На основании своих исследований Костычев даже высказал предположение, что некоторые растения способны создавать в зоне своей корневой системы благоприятные условия для массового развития азотобактера. К таким растениям он относит, прежде всего, табак, кукурузу и хлопчатник. Однако точка зрения Костычева не согласуется с данными Poshenrieder'a и Gräff'a [21] и видимо, несколько преувеличивает фактическое положение дела. Исследуя интенсивность развития азотобактера в ризосфере ржи, ячменя, пшеницы, конских бобов, люцерны, клевера и кормовой свеклы, Грэф установил, что наиболее интенсивное усвоение азота атмосферы происходит в питательных средах, зараженных корнями бобовых, ржи и ячменя. Меньшие количества связанного азота получаются при заражении корнями пшеницы и кормовой свеклы. Аналогичные различия были констатированы Исаковой [7] для культуры горчицы, вики, льна и конопли. В то время как культура горчицы и вики стимулирует развитие азотобактера, культура льна и конопли угнетает его развитие.

На основании перечисленных работ можно считать установленным, что вокруг корневой системы растений в почве происходит специфический отбор микрофлоры, отличающейся и по качеству и по количеству от микрофлоры почвы, не занятой культурой растений. Какие же причины приводят к такой селекции микроорганизмов вблизи от корня и на самом корне растения? Ответить на этот вопрос не так просто, так как могут оказывать влияние самые разнообразные факторы, однако всегда следует помнить, что важнейшим фактором являются корневые выделения растений. Их легко обнаружить в питательном растворе при постановке стерильных водных культур, что в свое время и было сделано Шуловым [18] по отношению к кукурузе и гороху. Количественный масштаб выделения органических веществ из корневой системы растений, естественно, небольшой, но, по исследованиям Lyon'a [23], может иногда достигать 5% от сухого веса растения за весь период вегетации. Не исключена возможность, что в почвенных условиях, где развивающаяся микрофлора постоянно потребляет диффундирующие из корня вещества, количественный масштаб выделений еще выше. Косвенное подтверждение этому положению можно видеть в опытах Демиденко [3, 4, 5] со стерильными водными культурами. В сосудах с бессменными и сменявшимися питательными растворами количество корневых выделений было неодинаково. При постоянной смене питательного раствора корни табака выделяли корневых выделений на 77% больше, чем при росте в бессменном растворе, а корни кукурузы — на 34% больше. Значительные различия были обнаружены между этими растениями и при пересчете количества корневых выделений на 1 г сухого веса урожая. В то время как корни табака выделили при культуре в сменных растворах 27 мг, корни кукурузы дали только 5,5 мг. Максимум выделений приходится на период цветения, что вполне согласуется с данными Старкея о наибольшем развитии бактерий ризосферы в период цветения. Общее количество корневых выделений за период вегетации достигает 1 136 мг у кукурузы (при урожае в 205,5 г) и 486 мг у табака (при урожае в 16, 24 г). Цифры получаются весьма внушительные и говорят о большом значении этих продуктов в жизнедеятельности почвенной микрофлоры.

Значительные количества корневых выделений были констатированы Трюффо и Бессоновым [24] для кукурузы. За период вегетации на одно растение кукурузы были выделено 618 мг органических веществ (378 мг глюкозы и 240 мг яблочной кислоты).

Качественный состав корневых выделений различных растений

очень мало изучен, но он, наверное, не одинаков. Вполне естественно поэтому предполагать, что и влияние корневых выделений различных растений на отдельных представителей почвенной микрофлоры также не одинаково. Подтверждением этому могут служить опыты Красильникова [13] с азотобактером. Ему удалось установить, что в ризосфере пшеницы этот организм почти совсем не развивается, а в ризосфере кукурузы развивается довольно хорошо. Попытка получить развитие азотобактера в ризосферном растворе, помещенном в пробирки, также не дала результата. Даже на агаре со средой Эшби, но с примесью ризосферного раствора азотобактер отказывался расти, в то время как питательный раствор для культуры растений без корневых выделений не оказывал депремирующего влияния. На этом основании Красильников высказал предположение, что корневые выделения пшеницы содержат токсически действующие вещества. Однако наблюдения Красильникова являются пока единичными и не позволяют сделать более широких выводов. Скорее напротив, можно думать, что они имеют ограниченное значение, так как было получено хорошее развитие азотобактера в ризосфере кукурузы и гречихи. Опыты были поставлены в песчаных культурах (глиняные горшки с песком опускались наполовину в сосуд с раствором Прянишникова — без азота) с кукурузой, зараженной азотобактером, и позволили констатировать, что корневые выделения этого растения стимулируют развитие азотобактера (число клеток увеличивается) и фиксацию им азота атмосферы (прибыль азота в сосуде достигла 10 мг). Однако такое положение продолжается только до цветения. В дальнейшем кукуруза сильно подкисляет раствор и приостанавливает развитие азотобактера. На самых корнях кукурузы удается обнаруживать значительное количество клеток азотобактера. Если корни перенести на пластинку с кремневым гелем, пропитанным средой для развития азотобактера, то около них получается обильное образование колоний. Все это свидетельствует о возможности развития азотобактера за счет корневых выделений растения. Аналогичные опыты с овсом и просом дали худшие результаты и тем самым подтвердили данные Красильникова о специфическом влиянии корневых выделений различных растений на активность развития азотобактера в ризосфере.

В связи с тем, что корневые выделения ряда растений оказывают благоприятное влияние на азотобактер, встает новый существенный вопрос: какие количества азота могут быть фиксированы азотобактером за счет этого источника органического вещества? Первые наблюдения в этом направлении были произведены Трюффо и Бессоновым. Им удалось вырастить в стерильном песке с минеральными солями (без азота) кукурузу, заражая среду тремя бактериями: Azotobacter, сопутствующей бактерией β и Clostridium Pasteurianum. Азот в культуре отсутствовал, однако кукуруза получила хорошее развитие и содержала в урожае 585 мг азота. Весь азот она могла получить только при посредстве азотфиксирующих бактерий, которым она предоставила через свою корневую систему 618 мг органических веществ в форме корневых выделений (глюкоза и яблочная кислота). Сопоставление этих цифр показывает, что продуктивность использования органического вещества азотфиксирующими бактериями (главным образом Clostridium Pasteurianum) получилась настолько исключительная, что может вызвать справедливое сомнение. Но если мы допустим, что отдельные цифры недостаточно точны, особенно по количеству выделенных органических веществ, то все же факт использования кукурузой азота, связанного свободно-живущими азотфиксирующими бактериями, эти опыты демонстрируют вполне наглядно.

Однако перечисленные выше работы велись преимущественно в не-

стерильных условиях, а потому они и не могут служить надежным материалом для оценки значения корневых выделений в фиксации азота атмосферы.

Некоторый сдвиг в методическом решении этого вопроса можно отметить в работе Мешкова [16]. Он ставил свои опыты в стерилизованной и нестерилизованной почвах, значительно разбавленных кварцевым песком. В качестве источников углерода были использованы глюкоза и бензойная кислота. В стерилизованной серии поливка осуществлялась стерильной водой, но в культуре не была соблюдена полная стерильность. Автор не только определил прямое действие органических удобрений и азотобактера, но проследил на протяжении четырех лет и последействие. Полученные им результаты можно свести к следующим положениям: внесение культуры азотобактера без органического вещества дало положительный эффект в суммарном урожае кукурузы за 4 года (около 20%) на предварительно стерилизованной почве (по общему азоту повышение соответствует 25%) и около 15% в первом году опыта на почве, не подвергавшейся предварительному нагреванию. В последнем случае основная часть дополнительного урожая связана, видимо, с использованием корневых выделений кукурузы. По гречихе этот вариант дал еще большую прибавку урожая в первом году опыта (25%). В последующие годы эффекта от азотобактера не наблюдалось. При внесении азотобактера вместе с органическими веществами (глюкоза и бензойная кислота) на нагревавшуюся почву дало некоторое понижение урожая в первом году, но зато сопровождалось значительным повышением его в последующие годы (суммарно около 30%).

Среднегодовое повышение урожая кукурузы за счет азота, фиксированного азотобактером на базе корневых выделений, получилось только в частично стерилизованной почве (15%), а на почве не стерилизованной заметного эффекта не было. Лучшие результаты получились в первом году опыта для гречихи и горчицы. Первая культура дала повышение урожая на 20%, а вторая на 15%. В последующие годы эффекта от заражения азотобактером тоже не наблюдалось. Вполне удовлетворительные результаты были получены в вегетационных опытах Блинкова [1, 2] с кукурузой. В ризосфере этого растения клетки азотобактера развивались вполне успешно и вызвали повышение общей массы урожая на 45,5% и початков на 59,3%. В ризосфере же пшеницы азотобактер развивался весьма слабо и дал очень небольшую прибавку урожая. Этот результат согласуется с наблюдениями Красильникова.

Хотя все вышеприведенные данные и говорят о положительном влиянии корневых выделений на фиксацию азота атмосферы азотобактером, однако они страдают одним общим недостатком: результаты опыта относятся к целому комплексу почвенных условий, где влияние одного фактора легко наслаивается на влияние другого. Для точного решения вопроса — какова роль корневых выделений в фиксации азота атмосферы азотобактером, необходимы опыты с монобактериальной культурой этого организма, где азотобактер будет единственным представителем почвенной микрофлоры, влияющим продуктами своей жизнедеятельности на развитие высшего растения. Для такого типа опытов нужна была подходящая методика, позволяющая поддерживать действительно стерильные условия в питательном субстрате. Знакомство с описанными в литературе методами для стерильной культуры растений привело нас к убеждению, что ни один из них не отвечает всем нашим требованиям. Наиболее подходящей для нас была бы методика Шулова, но его цилиндро-конические трубки, изолирующие прорастающее семя от раствора, нам представлялись мало пригодными. Кроме того,

та степень аэрации, которая могла быть создана в сосудах, не могла считаться достаточной для обеспечения кислородом и азотобактера и корневой системы высшего растения. Наконец, возможность взятия проб во время культуры растений для химического и бактериологического анализов в модификации Шулова не была достаточно обеспечена. Все это вместе взятое и привело нас к необходимости разработать собственную модификацию метода стерильной культуры высшего растения, подробно описанную в нашем предыдущем сообщении [19]. Эта модификация позволяет вести опыты и в стерильных условиях, и с использованием отдельных групп микроорганизмов. Пользуясь этой методикой, мы и провели ниже описываемые опыты с кукурузой, инокулированной азотобактером.

Для опытов служила видоизмененная среда Гельригеля следующего состава (в граммах):

$CaCl_2$ — 1,663
KCl — 0,750
KH_2PO_4 — 1,360
$MgSO_4$ — 0,600
$FeCl_3$ — 0,125
$Ca(NO_3)_2$ — 0,246
Дистиллированной воды — 5 л

В большинстве сосудов питательная среда содержала только небольшое количество азота, отвечавшее одной десятой части от полной смеси Гельригеля (0,246 г $Ca(NO_3)_2$ содержат 0,042 г азота). Малая доза азота предназначалась для развития растений в первые периоды их культуры. В варианты опыта с полной дозой азота вводилось 2,460 г азотнокислого кальция на 5 л раствора, что отвечает 0,420 г азота на сосуд. Для смещения pH ближе к нейтральной зоне в каждый сосуд дополнительно вводилось по 20 см³ 0,1 *N* K(OH). В результате был получен питательный раствор, имевший pH = 5,88.

После введения раствора сосуды монтировались согласно нашему описанию [17] и стерилизовались в автоклаве при 120° 2 часа. Посев производился семенами кукурузы, предварительно 40 мин. стерилизованными 1% раствором брома в воде и пророщенными в стерильной водопроводной воде. При посеве в часть сосудов добавлялась бактериальная суспензия чистой культуры Azotobacter chroococcum, выделенной нами из почвы опытного поля сельскохозяйственной Академии им. Тимирязева. Культура азотобактера предварительно выращивалась на маннитном агаре следующего состава (в граммах на 1 л):

Маннит — 20
K_2HPO_4 — 0,5
$CaHPO_4$ — 0,3
$MgSO_4$ — 0,3
K_2SO_4 — 0,2
$NaCl$ — 0,5
$CaCO_3$ — 5,0
$FeCl_3$ — 0,2
H_3BO_3 — 0,005
$MnSO_4$ — 0,005
$ZnSO_4$ — 0,002
$Al_2(SO_4)_3$ — 0,003
агар — 20,0
Молибденовокислый аммоний — 0,005
Дистиллированной воды — до 1 л

На этой среде, разработанной нами в процессе исследований по обмену веществ у азотобактера и учитывающей данные по влиянию различных элементов на этот организм, азотобактер не только быстро развивается, но и многие годы успешно культивируется, не показывая признаков вырождения или ослабления своего развития, в то время как на среде Бейеринка и Эшби он довольно быстро вырождается. Этой средой мы и пользовались в большинстве наших опытов с культурой азотобактера.

В связи с тем, что постановка стерильных и монобактериальных культур высших растений довольно сложна по технике выполнения и требует значительной затраты времени и труда, разнообразие вариантов приходится, по возможности, сокращать. В нашем опыте (в 1938 г.) были использованы следующие варианты:

1. Полная смесь Гельригеля [азот в количестве 0,42 г на сосуд в форме $Ca(NO_3)_2$].
2. То же + Azotobacter chroococcum.
3. Смесь с 0,10 нормы азота [0,042 г азота в форме $Ca(NO_3)_2$].
4. Смесь с 0,10 нормы азота + Azotobacter chroococcum.
5. Смесь с 0,10 нормы азота + смесь микроэлементов + Azotobacter chroococcum.
6. Смесь с 0,10 нормы азота + бор + Azotobacter chroococcum.

В каждый сосуд добавлялось по 5 $см^3$ раствора смеси микроэлементов следующего состава (в граммах):

H_3BO_3 — 5,0 $ZnSO_4$ — 2,0
$MnSO_4$ — 3,0 $Al_2(SO_4)_3$ — 3,0
Молибденовокислый аммоний — 5,0
Дистиллированной воды — до 1 л

В вариантах опыта, где в качестве единственного микроэлемента добавлялся бор, последний вводился в количестве 5,72 мг на сосуд в форме H_3BO_3.

В этой серии опыта мы ставили своей задачей определить влияние азотобактера на развитие высшего растения в условиях монобактериальной культуры, где корневые выделения растения могут использоваться только этим представителем почвенной микрофлоры. Нам казалось, что в таких условиях имеется возможность точнее выяснить взаимодействие между азотобактером и корневой системой высшего растения. Включение в серию опыта вариантов с микроэлементами представлялось интересным по ряду причин. Во-первых, в литературе имелись указания на то, что отдельные микроэлементы (молибден, ванадий и др.) повышают активность азотобактера в чистой культуре. В связи с этим представлялось интересным установить, как будет влиять смесь микроэлементов на взаимодействие между азотобактером и высшими растениями. Отдельно от смеси микроэлементов был испытан только бор, благоприятное влияние которого на клубеньковые бактерии уже хорошо известно. Молибден нами не был выделен отдельно потому, что в наших опытах с влиянием азотобактера на урожай овса в условиях почвенной культуры он не оказал заметного влияния.

По каждому варианту опыта засевалось два параллельных сосуда, но некоторые из них вышли из опыта по техническим причинам и дальнейшему исследованию не подвергались. Поэтому данные для некоторых вариантов будут приведены только для одного сосуда. Посев был произведен 29 мая семенами кукурузы, в течение 40 мин. стерилизованными 1% раствором брома в воде, в специальном стерилизаторе, описанном ранее [17]. К 17 июня растения заметно развились, но у них стали желтеть листья. Для устранения хлороза было добавлено по 10 $см^3$ стерильного 1% раствора хлорного железа. Через два дня листья вновь стали зелеными. Испарявшаяся растениями вода пополнялась добавлением стерильной дистиллированной воды по весу сосуда. 28 июля были взяты пробы для химического и бактериологического анализов. Аминокислоты, аммиак, азотистокислые и азотнокислые соли ни в одном сосуде не были обнаружены. Даже в сосуде с полной смесью к этому времени вся селитра была использована.

Опыт был закончен 15 сентября. Анализ растворов показал, что и в конце опыта ни в одном сосуде нет аммиака, азотистой и азотной

кислот. Пробы на аминокислоты и глюкозу также оказались отрицательными. Если из корневой системы кукурузы и выделялись в течение периода вегетации органические соединения в питательный раствор, то они были использованы культурой азотобактера, тем более, что и количественный масштаб их выделения, как показали в свое время исследования Шулова [18], весьма незначителен. В какой мере они отразились на деятельности азотобактера и как эта деятельность в свою очередь отразилась на росте кукурузы могут показать урожайные данные, баланс азота в культуре и количественные изменения в содержании клеток азотобактера в растворе. Начнем рассмотрение полученных данных с урожая.

Таблица 1

Влияние Azotobacter chroococcum на урожай кукурузы и азотный баланс в сосуде в условиях монобактериальной культуры

№ вариантов	Варианты опыта	№ сосудов	Общий урожай		Азотный баланс				Развитие Az. chroococcum при высеве на маннитный агар
			в год на сосуд	в % от сосуда с полным азотным питанием	азот в г, внесенный в сосуд	азот в г, найденный в урожае	азот в г, оставшийся в сосуде	азот в г, фиксирован. из атмосферы	
1.	Полная смесь Гельригеля	1 2	44,20 39,70	100	0,420 0,420	0,834	0,009	0,003	Нет
2.	Тоже + Azotobacter	1 2*	44,80 —	106,8 —	0,420 —	0,469 —	0,015 —	0,064 —	Очень сильн.
3.	Смесь с 0,10 нормы N + Azotobacter	1 2	7,40 8,40	18,9	0,042 0,042	0,133	0,004	0,053	Очень сильн. (в колон. диклококки)
4.	Смесь с 0,10 нормы N + смесь микроэлементов + Azotobacter	1 2	10,60 7,70	21,8	0,042 0,042	0,147	0,003	0,066	Очень сильн. (в колон. диклококки)
5.	Смесь с 0,10 нормы N + бор + Azotobacter	1 2	11,10 9,20	24,4	0,042 0,042	0,163	0,005	0,084	Сильное
6.	Смесь с 0,10 нормы N	1 2	7,10 7,30	17,2	0,042 0,042	0,097	0,009	0,013	Нет

* Сосуд исключен из опыта по техническим причинам.

Как можно видеть из приведенных данных, во всех вариантах опыта, где вводилась в сосуд чистая культура Azotobacter chroococcum урожаи получились несколько выше, чем в сосудах без внесения этого организма. Так, например, в варианте № 6 без внесения азотобактера урожай кукурузы составил только 17,2% от урожая с полным питанием минеральным азотом, а в параллельном варианте с инокуляцией азотобактером (№ 3) он поднялся до 18,9%. Отмеченная разница связана с азотфиксирующей активностью азотобактера. Об этом говорят два факта: 1) некоторое увеличение урожая и 2) увеличение содержания азота в культуре, достигшее в этом варианте 50 мг на 2 сосуда. Оба факта указывают на возможность использования азотобактером корневых выделений кукурузы, с одной стороны, и на доступность для кукурузы по крайней мере части фиксированного азотобактером азота — с другой стороны.

Еще выше оказались урожаи в сосудах, где азотобактер вносился в питательный раствор, обеспеченный смесью микроэлементов. В их присутствии азотфиксирующая способность азотобактера явно возросла (фиксировано 66 мг азота) и привела к параллельному повышению уро-

жая. Любопытно отметить, что в варианте № 5, где из использованной смеси микроэлементов добавлялся только один бор, урожай был даже выше, чем при внесении общей смеси микроэлементов. Прибыль азота в этом варианте также была максимальной, достигнув 80 мг на два сосуда. На этом основании можно предполагать, что не все микроэлементы оказывают одинаково положительное влияние. Если для бора положительное влияние оказывается как будто несомненным, то среди общей смеси микроэлементов, видимо, имеется вещество, отрицательно влияющее на активность азотобактера. Поскольку в нашем опыте отдельно был выделен только бор, установить природу отрицательно влияющего элемента не представляется возможным. Для этой цели следовало бы с каждым элементом поставить отдельные варианты, но в условиях монобактериальных культур эта задача потребовала бы слишком большого усложнения опыта. Мы обращаем внимание исследователей на эту сторону дела по двум причинам: 1) не следует доверяться данным о необходимости для любого организма целой группы микроэлементов, а в каждом конкретном случае нужно искать действительно необходимые элементы и 2) следует признать бор важным микроэлементом для активной работы азотобактера. Эта часть наших данных впервые указывает на необходимость для успешной деятельности азотобактера бора, играющего столь существенную роль в жизнедеятельности клубеньковых бактерий. Таким образом между клубеньковыми бактериями и азотобактером устанавливается еще одна черта сходства — их одинаково положительное отношение к бору. В обоих случаях активность фиксации азота атмосферы явно возрастает и указывает на существенное значение этого элемента в важнейшем процессе жизнедеятельности азотфиксирующих бактерий. Если в одной из работ Burk'a указывается на специфическое значение для азотобактера молибдена, то наши данные указывают на положительное значение для азотфиксации бора.

Итоги приведенного опыта показали, что хотя корневые выделения кукурузы и могут стимулировать азотфиксацию азотобактера, однако количества фиксированного азота весьма невелики и повышение урожая незначительно. Масштаб полезной деятельности азотобактера, повидимому, ограничен малыми дозами доступных источников углерода.

Для большей уверенности в правильности наших заключений опыт был повторен в следующем году (1939), хотя и по видоизмененной схеме. В частности, нам казалось целесообразным варианты с внесением Azotobacter chroococcum разделить на две части: в один сосуд внести только культуру Azotobacter'a, а в другой — Azotobacter + Proteus vulgaris. В условиях продолжительной водной культуры часть клеток Azotobacter'a могла отмирать, но, в силу очень медленного автолиза, азот белковых веществ протоплазмы этих клеток все же оставался недоступным растениям. Дополнительное введение Proteus vulgaris могло ускорить аммонификацию белковых веществ отмирающих клеток азотобактера и дать дополнительные источники азотного питания для растения. Исходя из этих соображений, в опыте второго года были использованы только следующие варианты:

1. Полная смесь Гельригеля + Azotobacter chroococcum (N = 0,42 г на сосуд).
2. То же + Azotobacter chroococcum + Proteus vulgaris.
3. Смесь с 0,15 нормы азота + Azotobacter chroococcum.
4. Смесь с 0,15 нормы азота + Azotobacter + Proteus vulgaris.

Во всех сосудах смесь минеральных удобрений содержала и микроэлементы. Количество вводимого азотобактера также было увеличено. Для этой цели мы выращивали в больших чашках Петри на маннитном

агаре чистую культуру Azotobacter chroococcum, снимали ее стерильным шпателем, смывали стерильной дистиллированной водой и полученную взвесь клеток вносили в количестве 50 см³ в каждый сосуд. Содержание общего азота в добавляемой суспензии азотобактера (в 50 см³) соответствовало 0,0089 г. Proteus vulgaris вносился из расчета одной пробирки косого агата с этим микроорганизмом на два сосуда. Посев стерильными семенами кукурузы был произведен 22 мая, а культура Azotobacter'a и Proteus vulgaris была внесена 2 июня, после того как растения выбились за пределы вегетационной трубки сосуда. По каждому варианту был поставлен только один сосуд. Результаты опыта второго года сведены в табл. 2.

Таблица 2

Влияние Azotobacter chroococcum на урожай кукурузы и баланс азота в сосуде в условиях дибактериальной культуры

№	Варианты опыта	№ сосудов	Общий урожай		Баланс азота				Развитие Azotobact. при высеве а маннитный гель в конце опыта
			в г на сосуд	в % от сосуда с полным азотным питанием	азот в г, внесенный в сосуд	азот в г, найденный в урожае	азот в г, в растворе сосуда	азот в г, фиксированный из атмосферы	
1.	Полная смесь Гельригеля + Azotobacter . .	1	57,85	100	0,420	0,436	0,0117	0,0277	Хорошее
2.	То же + Azotobacter + + Proteus vulgaris .	1	62,30	107,9	0,420	0,442	0,0243	0,0463	»
3.	Смесь с 0,15 нормы N + + Azotobacter	1	12,85	22,2	0,063	0,1011	0,0095	0,0476	Очень хорошее
4.	Смесь с 0,15 нормы N + Azotobacter + + Proteus vulgaris . .	1	12,97	22,3	0,063	0,1109	0,0107	0,0586	»

Результаты этого опыта также показали, что внесенная культура Azotobacter'a может в небольшом количестве фиксировать азот атмосферы за счет корневых выделений растений, но масштаб его деятельности небольшой, а потому и повышение урожая весьма незначительно. Даже в самых благоприятных случаях урожаи кукурузы на среде с 0,15 нормы азота не превосходят 24% от контроля с полным азотным питанием. На основании двухлетних опытов по изучению азотфиксирующей способности азотобактера за счет корневых выделений кукурузы мы можем признать, что его влияние на урожай растения незначительно, хотя и положительно. Нужно думать, что создание более благоприятных условий для развития этого организма, хотя бы за счет дополнительного введения в раствор органических веществ, может усилить азотфиксацию и тем самым повысить положительный эффект от инокуляции раствора азотобактером. Эта возможность была исследована нами в другой серии опытов, результаты которых будут изложены в следующем сообщении.

Наряду с учетом урожая были произведены определения азота как в урожае, так и в питательном растворе. Полученные данные представляют существенный интерес для понимания взаимоотношений между азотобактером и высшими растениями. Во всех вариантах опыта добавленная культура Azotobacter chroococcum дала заметную прибыль азота за счет атмосферы и тем самым показала несомненную способность к азотфиксации и в условиях моно- или дибактериальной культуры высшего растения. Значительная часть фиксированного азота оказалась

в урожае и тем самым вновь подтвердила выделение азотобактером в окружающую среду азотистых веществ, доступных для усвоения высшим растением. Цифры вышеприведенных таблиц эту возможность определенно устанавливают, так как азот, оставшийся в растворе, всюду превосходит первоначальное содержание азота внесенных клеток азотобактера. Из этого следует, что прибыль азота в урожае не могла получиться иначе, как за счет выделения азотистых веществ из клеток азотобактера. На основании полученных данных можно считать установленным, что природа положительного действия азотобактера в большей мере связана не с выделяемыми им ростовыми веществами, а с продуктами фиксации азота атмосферы. Таким образом, спор о природе действия азотобактера, по нашему мнению, нужно решить в пользу его азотфиксирующей способности, хотя и гормональное действие может иметь свое значение.

Дополнительное внесение в раствор Proteus vulgaris несколько повышает урожай, но не снижает количества азота, остающегося в растворе,— даже напротив, в отдельных случаях повышает его содержание. На основании этих данных следует предполагать, что культура этого микроба если и вызывает частичный распад отмерших клеток азотобактера, то эффект от его действия относительно небольшой. Главное значение, повидимому, принадлежит продуктам азотфиксации, выделяемым азотобактером в окружающую среду. Судя по повышению азотфиксации, можно предполагать, что за период вегетации выделяется из корневой системы около 10—15% сухого вещества в форме корневых выделений.

Выводы

1. Azotobacter может фиксировать азот атмосферы за счет корневых выделений высшего растения (кукурузы).
2. Максимальные количества фиксированного азота отвечают 84 мг на 2 сосуда, содержащих по два растения кукурузы.
3. Некоторая часть фиксированного азота атмосферы выделяется Azotobacter в раствор в доступной для растений форме (повидимому, аммиака) и увеличивает их урожай. Однако значительная часть азота остается в растворе в составе клеток азотобактера и недоступна растениям.
4. Внесение в раствор Proteus vulgaris не увеличивает количества доступного растениям азота за счет аммонификации отмерших клеток азотобактера, и не снижает количества азота, остающегося в растворе. В присутствии Proteus vulgaris, повидимому, несколько повышается и общая активность азотобактера.
5. Положительный эффект от инокуляции азотобактером связан с его азотфиксирующей способностью, а не с выделяемыми им ростовыми веществами.

Лаборатория физиологии растений и микробиологии
Московской ордена Ленина сельскохозяйственной
академии им. К. А. Тимирязева

Получено 30.I.1944

ЛИТЕРАТУРА

1. Блинков Г. Взаимоотношения между высшими растениями и азотобактером. Тр. Пед. ин-та в Томске, вып. 1, стр. 19, 1939.
2. Блинков Г. Влияние азотобактера и частичной стерилизации почвы на урожай и белковый обмен овса. Тр. биол. ин-та Томского ун-та, т. 3, стр. 31, 1933.
3. Демиденко Т. Используют ли высшие растения атмосферный азот при помощи азотобактера. Научно-агроном. журн. № 7—8, стр. 1928.

4. Демиденко Т. Из области питания и обмена веществ у высших растений. Изв. с/х акад. им. Тимирязева, № 3, стр. 133, 1, 1928.
5. Демиденко Т. Бактерии, фиксирующие свободный азот как азотистое удобрение злаков и табака. Дневник Всесоюзн. съезда ботаников 1928.
6. Демиденко Т. и Тимофеева Е. Азотобактер как источник азотного питания для высших растений. ДАН СССР, т. 14, стр. 205, 1937.
7. Исакова А. К вопросу о взаимоотношениях между высшими растениями и микроорганизмами. Изв. АН СССР, т. 7, стр. 993, 1934.
8. Исакова А. К вопросу о воздействии бактериориз на растения и о его сущности. Тр. Ин-та физиологии растений АН СССР, т. 2, вып. 1, стр. 5, 1937.
9. Исакова А. Распространение азотобактера в ризосфере субтропических культур. Тр. Ин-та физиологии растений АН СССР, т. I, вып. 2, стр. 266, 1937.
10. Костычев С., Рыскальчук А. и Швецова О. Биохимические исследования над Azotobacter agile. Тр. отд. с/х микробиологии, т. 1, стр. 91, 1926.
11. Костычев С., Шелоумова А. и Шульгина О. Азотный режим почв южного берега Крыма. Тр. отд. с/х микробиологии, т. I, стр. 5, 1926.
12. Костычев С. и Шелоумова А. Связывание атмосферного азота и образование аммиака Azotobacter. Изв. АН СССР, стр. 662, 1931.
13. Красильников Н. Влияние корневых выделений на развитие азотобактера и других почвенных бактерий. Микробиология, т. III, вып. 3, стр. 343, 1934.
14. Красильников Н. Очаговое распространение микроорганизмов в почве. Изв. АН СССР, стр. 192, 1936.
15. Красильников Н., Крисс А. и Литвинов М. Влияние корневой системы на микроорганизмы почв. Микробиология, т. V, вып. 2, стр. 270, 1936.
16. Мешков Н. Влияние азотобактера на урожай некоторых с/х растений. Диссертация. Москва. 1940.
17. Федоров М. Влияние азотобактера на азотный баланс почвы и урожай с/х. растений при удобрении почвы соломой. Микробиология, т. IX, вып. 6, стр. 541, 1940.
18. Шулов И. Исследования в области физиологии питания высших растений при помощи методов изолированного питания и стерильных культур, Монография, 1913.
19. Abbot E. Study of microbiological activities in some Lousiana soils. Lousiana Agric Exp. Stat. Bull. 194, p. 3, 1926.
20. Caron A. Landwirtschaftliche Bakteriol. Probleme. Landw. Versuch Stat., Bd. 45, S. 401, 1895.
21. Gräff C. Ueber den Einfluss des Pflanzenwachstums auf die Bakterien Wurzelbereich. Cbl. Bakt., II Abt., Bd. 82, S. 44, 1930.
22. Hiltner L. Ueber neuere Ergebnisse und Probleme auf dem Gebiete der landw. Bakteriologie. Angew. Botan., Bd. 5., S. 200, 1907.
23. Lyon T. Influence of higher plants of bacterial activities in soils. J. Am. Soc. Agron., v. 10, p. 313, 1918.
24. Truffaut G. et Bessonoff, Discussion des exper. faites de 1924—1926. Science Sol, v. 6, p. 44, 1927.

FIXATION OF ATMOSPHERIC NITROGEN BY AZOTOBACTER CHROOCOCCUM UNDER CONDITIONS OF MONOBACTERIAL CULTURE, AS AFFECTED BY ROOT SECRETIONS IN MAIZE

M. Fedorov

Summary

1. Azotobacter is able to fix the nitrogen of the atmosphere at the expense of the root secretions of higher plants (maize)

2. The maximum amount of fixed nitrogen corresponds to 84 mg per two vessels containing two maize plants each.

3. A certain portion of the fixed atmospheric nitrogen is evolved by Azotobacter into solution in a form accessible to the plant (apparently in the shape of ammonia); its effect is then to increase the yield. A con-

siderable part of the nitrogen remains however in solution in the cells of Azotobacter, being inaccessible to the plants.

4. The addition of Proteus vulgaris to the solution does not increase the amount of the nitrogen accessible to the plant at the expense of ammonification of the decayed cells of Azotobacter; neither does it reduce the amount of nitrogen remaining in solution. The total activity of Azotobacter seems to be somewhat intensified in the presence of Proteus vulgaris.

5. The beneficial effect produced by inoculations with Azotobacter is probably due to its nitrogen-fixing capacity rather than to the growth substances secreted by it.

The Timiriasev Agricultural Academy
Laboratory for Plant Physiology
and Microbiology
Moscow

РОСТ ТЕРМОФИЛЬНЫХ АКТИНОМИЦЕТОВ

А. А. Имшенецкий и *Н. М. Авдиевич*

Отмечая высокую биохимическую активность термофильных микробов, мы указывали, что она зависит от ряда причин [1, 2]. В этом комплексе причин главная роль бесспорно принадлежит быстрому размножению термофилов, приводящему в течение короткого срока к накоплению значительного количества биомассы. Последнее может иметь значение при практическом применении микроорганизмов, например при получении ферментативных препаратов.

Скорость деления бактериальных клеток зависит не только от условий культивирования, температуры, состава питательных сред и т. д., но и от систематического положения микроорганизма. Такие виды, как Bact. coli, Proteus vulgaris и ряд других неспороносных бактерий размножаются довольно быстро. В противоположность этому медленное размножение микобактерий и миксобактерий составляет характерную особенность этих организмов. Классическим примером медленно растущих микробов могут служить также актиномицеты, у которых для образования вполне развитой колонии требуется несколько дней.

Скорость развития микробов не может иметь абсолютного значения в борьбе за существование и ряд биологических особенностей у актиномицетов полностью компенсирует медленные темпы их роста. Иначе они должны были бы уступить место другим микроорганизмам.

Выясняя скорость развития различных термофильных микробов мы решили провести также опыты с термофильными актиномицетами.

Как быстро растут эти организмы? Способны ли они давать рост при относительно низких температурах?

Этим вопросам и посвящено настоящее краткое сообщение.

Экспериментальная часть

Термофильный актиномицет, с которым проводились исследования, был изолирован из воздуха. Приводим его краткую характеристику.

Мицелий моноподиально ветвящийся, воздушные гифы 0,1—0,15 μ толщины, с прямыми конидиеносцами. Споры шаровидные, 0,2—0,25 μ величины. Окраска по Граму отрицательная. Некислотоупорен. Колонии белые, плоские, гладкие, поверхностные, покрытые мучнистым налетом. Колонии имеют нежную радиальную складчатость, лучше заметную у края колонии. Актиномицет растет на мясопептонном, крахмально-аммиачном, картофельном агаре, а также на кусочках картофеля и мясопептонной желатине. Температурный оптимум роста 60°. На жидких средах (мясопептонный бульон, картофельный отвар и пивное сусло) термофильный актиномицет развивается плохо, дает пристеночный рост и отдельные мелкие колонии в толще жидкости.

Актиномицет разжижает мясопептонную желатину, сероводорода не образует, нитраты восстанавливает до аммиака.

На мясопептонном бульоне с глюкозой, сахарозой, лактозой, маннитом нет ни кислото-, ни газообразования. Крахмал не гидролизует, лакмусовое молоко подкисляет и пептонизирует. Свернутую кровяную сыворотку разжижает.

Этот вид не мог быть полностью идентифицирован с описанными уже термофильными актиномицетами. Ближе всего он стоит к Actinomyces nondiastaticus, отличаясь от него более округлой формой спор и отсутствием темнеющего роста на картофеле.

Исследования были начаты с культивирования актиномицета при различных температурах.

Отношение к температуре

Длительное время считали, что термофильные микроорганизмы совершенно не размножаются при относительно низких температурах, например 25—30°. В этих условиях они находятся в состоянии «скрытой жизни» и только при повышении температуры начинают размножаться. Температурный оптимум их роста лежит около 60°. Эта весьма распространенная точка зрения стала оспариваться после исследований Tanner'a Wallace [7] и Hansen'a [5]. В этих исследованиях сообщалось о том, что термофильные бактерии при низких температурах не находятся в «анабиотическом» состоянии, а постоянно размножаются, хотя очень медленно. Деление одной бактериальной клетки продолжалось 10 час., и подсчет клеток в культуре необходимо производить через несколько дней после посева. Таким образом, термофильные микроорганизмы принимают участие в круговороте веществ в природе и при сравнительно низких температурах (20—25°). Однако в этих условиях их биохимическая активность невелика.

Проверяя отношение термофилов к температуре, Солнцева в нашей лаборатории выяснила, что среди них существуют как формы, растущие при относительно низких температурах, так и виды, совершенно в этих условиях не развивающиеся. Исходя из биологической номенклатуры, мы предложили термофильные бактерии, растущие только при высоких температурах, называть стенотермными термофилами, а виды, обладающие широкой температурной амплитудой роста, обозначать как эвритермные термофилы. Последние встречаются в природе чаще, чем стенотермные термофильные бактерии. Таким образом, различная биология термофилов объясняет неодинаковое их отношение к более низким температурам.

Опыты с термофильными актиномицетами были проведены с помощью следующей методики. На чашки Петри с картофельным агаром наносился иглой посевной материал на поверхность среды. В каждую чашку производился посев в пяти местах. Параллельно посевы производились на картофельный агар, скошенный в пробирках, картофельный отвар и мясо-пептонный бульон. Пробирки и чашки выдерживались при различных температурах. Таким путем было установлено, что оптимум роста актиномицета 60°.

В одиннадцати опытах посевы на различные среды длительное время выдерживались в термостате при 36°. На жидких средах ни в одном случае не было роста. Что же касается плотных сред, то в одном опыте рост появился на третьи, а в другом на четырнадцатые сутки. В девяти опытах рост на твердых средах совершенно отсутствовал. Выраставшие колонии резко отличались от колоний, образуемых актиномицетом при высоких температурах. Они были значительно меньше по величине, только 2—3 мм в диаметре, вместо 20—25 мм при 60°. Колонии складчатые, морщинистые, врастающие в агар. Образование спор слабое. Темпы развития термофилов при 36° напоминают скорость роста психрофильных организмов при температурах, близких к нулю. При 19—23° в течение 75 дней роста на плотных средах не было совершенно. Это обстоятельство, а также непостоянное и медленное развитие при 36° позволяет отнести этот актиномицет к стенотермным термофильным микробам.

Относя изолированный актиномицет к термофильным, необходимо отметить, что, по мнению Lieske [6], термофильные актиномицеты возникают в культурах мезофильных видов при высокой температуре. Во

что пишет Lieske по этому поводу: «Значительное количество термофильных организмов, которые повсеместно распространены в природе, представляют собой только культуры, искусственно возникшие, как мутации, при высоких температурах от форм, развивающихся нормально также и при обычных температурах».

В связи с этим два мезофильных актиномицета Actinomyces rubroviolaceae и Actinomyces sp., образующий белый пигмент, были посеяны на различные среды (мясопептонный агар, крахмально-аммиачный агар, мясопептонный бульон). Посевы выдерживались при 60° в течение 7 дней. Контрольные посевы помещались в термостат с температурой в 36°. Таких опытов было проведено четыре, и всегда с одними и теми же результатами. Актиномицеты хорошо росли при 36°, но ни разу не развились при 60°.

Образование термофильных мутантов у актиномицетов, адаптированных сразу к 60°, теоретически мало вероятно. Известны исследования по адаптации микробов к высокой температуре, и все они говорят о том, что такое приучение требует много времени и предъявляет большие требования к терпению экспериментатора (Dieudonné [4], Tsiklinsky [8], Имшенецкий и Логинова [3] и др.). До сих пор никто не наблюдал внезапного образования варианта, обладающего значительно более высоким температурным оптимумом роста, чем исходный штамм.

Таким образом, у нас нет оснований считать термофилы «продуктом лабораторий», так как эта точка зрения требует экспериментального подтверждения.

Скорость роста

Скорость развития термофильного актиномицета определялась следующим образом.

На чашки с картофельным агаром производился посев культуры иглой. Посевной материал вносился в пяти местах, и чашки выдерживались при 60°. В одной серии опытов через 24, а в других через 48 или 72 часа чашки извлекались из термостата и диаметр колоний измерялся циркулем. Результаты этих измерений приведены в табл. 1.

Таблица 1

Рост колоний термофильного актиномицета

Возраст колоний (в час.)	Количество измеренных колоний	Средний диаметр колоний (в мм)	Средняя площадь колонии (в мм²)
24	104	10,75	91,21
48	102	19,00	283,38
72	108	26,21	530,66

Мы видим, что уже через сутки диаметр колонии достигает значительных размеров, а затем колонии продолжают увеличиваться (рис. 1). Такой рост для актиномицетов — явление необычное, так как мезофильные виды за сутки обычно не дают видимого невооруженным глазом роста. В дальнейшем термофильный актиномицет продолжает развиваться, и его колонии все увеличиваются в своих размерах, достигая через 72 часа 26 мм в диаметре.

Эти данные были дополнены опытами, в которых урожай актиномицетов определялся весовым путем. В стеклянные матрацы емкостью в 200 см³ и содержащие 30 см³ профильтрованного 20% картофельного отвара производился посев водной взвеси спор актиномицетов. После выращивания культуры при 60° она фильтровалась через бумажный до-

веденный до постоянного веса фильтр. В контрольных опытах фильтровалась среда сразу после внесения в нее посевного материала. Фильтры высушивались и снова взвешивались.

Эти опыты дали следующие данные (табл. 2).

Таблица 2

Развитие термофильного актиномицета в жидкой среде

Возраст культуры (в час.)	Количество культуральной жидкости (в см³)	Вес мицелия (в г)	
		опыт 1	опыт 2
24	120	0,0308	0,0156
48	120	0,0227	0,0175
72	120	0,0390	0,0199

В жидкой среде термофильные актиномицеты также развиваются быстро, и это подтверждает результаты опытов с плотными средами. Однако на картофельном отваре уже через 24 часа биомасса почти достигает своего максимума и хотя в последующие два дня она и увеличивается, но менее значительно, чем площадь колонии на плотных средах. Возможно, что это связано с недостаточной аэрацией культуры в жидкой среде. Отметим, что при 60° растворимость кислорода в среде уменьшается.

Рис. 1. Колонии термофильного актиномицета на МПА. Возраст колонии 70 час. (при репродукции уменьшено до $^3/_5$)

Прорастание спор

Споры термофильного актиномицета, помещенные при 60° на поверхность влажного крахмально-аммиачного или мясо-пептонного агара, быстро набухают. В связи с этим они увеличиваются в своих размерах, становятся матовыми, а затем начинают прорастать. Через 90 мин. после нанесения материала на поверхности агара прорастает 29,1% спор. При микроскопии видны споры в различных стадиях прорастания, встречаются споры с длинными, уже ветвящимися нитями и прорастающие двумя или тремя проростками, а также споры с небольшими «клювиками» — начальные стадии прорастания (рис. 2).

Производя такие же опыты с мезофильными актиномицетами при 37°, легко убедиться в том, что его споры прорастают значительно медленнее (рис. 3). Микроскопические картины, аналогичные тем, которые при проращивании термофильных актиномицетов наблюдаются через 90 мин., могут быть получены в опытах с мезофильными актиномицетами только через $4^1/_2$ часа, т. е. через 270 мин. Допустим, что прорастание мезофильных актиномицетов станет возможным при 60° и будет ускоряться при повышении температуры с 36° до 60°, тогда скорость их прорастания при 60° будет равна 90 мин. в том случае, если температурный коэффициент (Q_{10}) прорастания спор будет около 1,7. Такое предположение носит, конечно, гипотетический характер, но

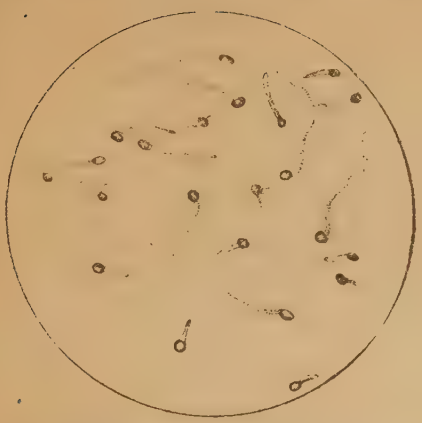

Рис. 2. Прорастание спор термофильного актиномицета при 60°. Микроскопическая картина через 2 часа после посева

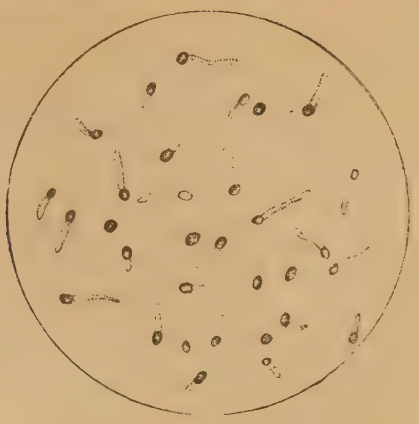

Рис. 3. Споры мезофильного актиномицета, прорастающие при 36° (через $3^1/_2$ часа после посева)

оно позволяет установить сравнительно высокое значение величины коэффициента.

Выводы

1. Изолированный актиномицет относится к стенотермным термофилам, так как при 36° дает очень слабый рост.

2. Мезофильные актиномицеты под влиянием высоких температур не образуют термофильных вариантов.

3. Рост мицелия и прорастание спор термофильных актиномицетов происходит при 60° исключительно быстро. Ускоренный рост составляет одну из специфических особенностей всех термофильных микроорганизмов.

Институт микробиологии
Академии Наук СССР Москва

Получено 25.*XI.1943*

ЛИТЕРАТУРА

1. Имшенецкий А. О скорости процессов, вызываемых мезофильными и термофильными бактериями. Микробиология, т. X, стр. 385, 1942.
2. Имшенецкий А., Солнцева Л. и Кузюрина Л. Термофильные амилолитические бактерии. Микробиология, т. XI, стр. 29, 1942.
3. Имшенецкий А. и Логинова Л. Адаптация дрожжей к повышенной температуре. Микробиология, т. XIII, стр. 136, 1944.
4. Dieudonné A. Beiträge zur Kenntnis der Anpassungsfähigkeit der Bakterien an ursprünglich ungünstige Temperaturverhältnisse. Cbl. f. Bakt., 16, 965, 1894.
5. Hansen A. The growth of thermophilic bacteria. Arch. f. Mikrob., 4, 23, 1933.
6. Lieske R. Morphologie und Biologie der Strahlenpilze, Berlin 1921.
7. Tanner F. and Wallace G. Relation of temperature to the growth of thermophilic bacteria, J. of Bact., 10, 421, 1925.
8. Tsiklinsky. Sur les thermophiles des sources thermales. Ann. Inst., Past. N. 10, 1899.

GROWTH OF THERMOPHILIC ACTINOMYCETES

A. Imšenecki and *N. Avdievich*

Summary

1. Isolated Actinomyces should be referred to stenothermic thermophiles, for at a temperature of 36° it gives but a poor growth.

2. When exposed to high temperatures, mesophilic actinomycetes fail to produce thermophilic forms.

3. At a temperature of 60°, the growth of the mycelium and the germination of spores proceed at an exceedingly high rate. The rapid growth is one of the specific features peculiar to all the thermophilic microorganism.

Institute of Microbiology of the
Academy of Sciences of the USSR
Moscow

АКТИНОМИЦЕТЫ ВОДОЕМОВ, КАК ОДНА ИЗ ПРИЧИН ЗЕМЛИСТОГО ЗАПАХА ВОДЫ

Б. Л. Исаченко и *А. А. Егорова*

Во многих реках Европы и США нередко наблюдалось появление землистого запаха и привкуса, делающих воду не только мало приятной, но даже не пригодной для питья, а мясо пойманных рыб имело тоже землистый привкус и становилось поэтому малоценным [7, 8].

В настоящей статье мы коснемся только случаев приобретения водой характерного землистого запаха, но необходимо отметить, что воде различных водоемов могут быть присущи самые разнообразные запахи и привкусы: затхлый, рыбный, огуречный и т. п. Эти запахи чаще всего связаны с развитием в водоеме определенных групп организмов (водоросли, плесневые грибы и т. п.), которые могут особенно сильно развиваться от тех или других причин в определенные периоды года [2, 4, 6]. Наличие запаха, приобретаемого водой, иногда бывает выражено настолько слабо, что почти не улавливается и поэтому не всегда обращает на себя внимание, но неожиданная «вспышка», когда вода как бы вдруг приобретает резко выраженный запах землистого характера, уже поневоле привлекает внимание и вызывает беспокойство. По прошествии некоторого времени появившийся запах постепенно исчезает, вода становится обычной и все успокаивается впредь до новой «вспышки». Таково обычное отношение к явлению, требующему пристального внимания и своевременного устранения его причин. Появлявшийся в некоторые годы (1911, 1936, 1939) сильный землистый запах в воде Москвы-реки заставил обратить внимание на изучение этого явления, с тем чтобы попытаться объяснить причину его появления и устранить повторение. Результаты исследований, выполненных по поручению Моссовета Комиссией Академии Наук СССР [1], нашли отражение в нескольких ее отчетах, переданных в Управление Водопроводно-коммунального хозяйства и дающих ясную картину положения дела. Настоящая статья, кратко излагающая некоторые результаты исследований, была составлена в 1941 г.

Появлявшийся в воде землистый запах настолько сходен с запахом, присущим культурам актиномицетов, что не возникало сомнений в его происхождении и необходимы были только доказательства, чтобы установить, что первопричиной запаха является развитие актиномицетов [1]. Повсеместное и широкое распространение актиномицетов в почвах приводило, естественно, к допущению, прежде всего, влияния актиномицетов береговых почв на приобретение водой землистого запаха. Первые же исследования подтвердили значение изменения адсорбционных способностей приречных песков и прибрежных почв на

[1] Исследования 1939—1940 гг. были выполнены по предложению Моссовета комиссией, образованной Академией Наук СССР под председательством акад. А. Е. Ферсмана и составленной из двух бригад: химической — акад. Н. Д. Зелинского и биологической — члена корр. АН СССР Б. Л. Исаченко. В эту последнюю комиссию вошли: проф. С. Н. Скадовский, Н. К. Дексбах, А. А. Егорова, А. И. Рыбалкина, Е. Н. Назарова и др.

Нужно сказать, что в 1937 г. в Институте микробиологии АН СССР работала по этому же вопросу группа сотрудников Института [3].

возможное вымывание пахучих продуктов актиномицетов и других микроорганизмов в речные воды. По произведенным наблюдениям, оказалось, что песчаные, почти не содержащие глинистых частиц, но богатые актиномицетами и грибами почвы верхней террасы берегов Москвы-реки действительно могут отдавать вещества с землистым запахом. Вымывание почв должно происходить особенно легко после высыхания их в жаркое лето или промораживании зимой, при наступлении таяния снега или выпадении сильных дождей (5). Излагаемые здесь в нескольких словах результаты исследований дают определенное представление о той роли в появлении запахов в воде, которую могут играть актиномицеты береговых почв в связи с изменяющимися адсорбционными способностями приречных песков и почв. Вместе с тем возникает, однако, вопрос о возможной самостоятельной роли актиномицетов, попавших в водоемы и развивающихся там, а возможно, и вообще привычных к развитию в водной среде с образованием пахучих веществ. Что актиномицеты — обитатели не только суши, но в такой же степени и водных грунтов, можно, казалось бы, заключить из исследований, выяснявших роль их в образовании илов и лечебных грязей в солоноватых водоемах. Эти соображения побудили исследовать видовой состав актиномицетов водоемов и выявить их биологические особенности и условия образования ими в воде пахучих продуктов, так как этот вопрос дал толчок к настоящим исследованиям.

Микробиологическому обследованию были подвергнуты р. Москва в районе Рублева и ближайшие ее притоки: Чаченка, Старица (Староречье) и Сомынка. Полные биологическая и физико-химическая характеристики обследованных водоемов даны в отчетах С. Н. Скадовского и его сотрудников, что позволило составить довольно ясное представление об условиях, в которых происходит развитие микрофлоры в изучавшихся водоемах.

Первое место по загрязнению и запаху занимает среди притоков р. Сомынка. В эту реку, выше впадения Серебрянки, периодически спускают фекальные воды, и вода имеет характерный землистый запах с массовым развитием актиномицетов в илах. В илу же идет и сероводородное брожение. Ниже по течению, после впадения в Сомынку Серебрянки и ключей, происходит разжижение ее воды, и фекальное загрязнение ослабевает, усиливаясь в то же время загрязнением, вносимым дер. Барвихой. В воде можно обнаружить наличие аммиака (август — октябрь) и заметные количества азотистой кислоты. Течение реки весьма замедленное благодаря подпору Москвы-реки; глубина в местах забора проб воды около 50 см, население β мезасопробное; в илу, как увидим дальше, существуют громадные количества не только бактерий и грибов, но и актиномицетов. Количество кислорода в воде (конец октября) дефицитное (79% насыщения).

Вода р. Старица в свою очередь сильно загрязнена органическими веществами (12—18 мг кислорода на 1 л воды), богата погруженной растительностью (Nuphar, Nymphea и др.), зарослями водной гречихи. У Глухова глубина Старицы 1,2—1,5 м, грунт образует глинисто-илистые отложения; под влиянием ветра происходит перемешивание воды до дна. Количество кислорода (лето — осень) не ниже 84% насыщения в придонных слоях. В сентябре и ноябре (1939) в воде обнаружена азотистая кислота, но аммиака не найдено.

У Архангельского течение Старицы более замедленное; глубина доходит до 3,75 м, водная растительность развивается главным образом у берегов; грунт — глина с органическими остатками; при ветре сильное перемешивание воды, содержание кислорода — не ниже 84% насыщения.

В воде (сентябрь, октябрь) обнаружены аммиак и азотистая кисло-

та. Планктон богаче, чем в других местах обследованного района. В некоторые периоды воде свойственен интенсивный своеобразный запах; сильным запахом обладает и ил. По сравнению с водой ил богаче бактериями и громадными количествами актиномицетов.

Течение другого притока, р. Чаченки, подперто водой Москвы-реки. глубина ее всего 20—25 см, течение заметное — 16,1—25 см/сек. Дно песчаное, с небольшой примесью ила у берегов. Осенью в реке отлагается огромное количество опадающих листьев и вместе с тем увеличивается количество растворенных в воде органических веществ (на 57%). Насыщение воды кислородом составляет в среднем 88,5—91%. Вода реки во время паводка и сильных ливней заметно загрязняется (навоз, кал и т. п.) из вышележащих районов. В иле много пахнущих плесневых грибов (Penicillium и др.).

Таково, в общем, довольно определенное — неблагополучное состояние обследованных притоков, детально изученных с точки зрения населяющих их организмов планктона и бентоса (С. Н. Скадовский, П. И. Усачев и др.).

Все обследованные притоки отличаются условиями, благоприятствующими развитию разнообразной микрофлоры, среди которой хорошо развиваются и те, которые могут влиять на появление запаха в воде Москвы-реки. Поэтому на устранение загрязнения их необходимо обратить внимание.

Пробы воды и ила Москвы-реки брали в четырех пунктах: выше и ниже Старицы, ниже Сомынки и у Чаченки.

Глубина Москвы-реки выше Старицы 4,0—4,5 м, течение быстрое; содержание кислорода высокое — свыше 90% насыщения, дно песчаное (песок и гравий). Окисляемость воды — 4,09. Ни аммиака, ни азотистой кислоты не обнаружено.

Место взятия проб ниже Старицы находится в 75—100 м от впадения ее в Москву. Глубина тут 4,5—4,75 м, течение медленное. Грунт — песок с небольшим количеством на поверхности его ила, возможно занесенного из Старицы. В воде обнаружена азотистая кислота, аммиака не было (сентябрь—октябрь). Окисляемость воды — около 8. Количество легко окисляемых органических веществ в иле значительно (414 мг кислорода на 100 г сухого ила). Количество кислорода в воде высокое (не ниже 90% насыщения). Население этого пункта Москвы-реки в основном занесено из р. Старицы.

Москва-река ниже Сомынки характеризуется значительной массой воды, небольшим течением, глубиной 3,5—3,75 м, песчаным дном с небольшим количеством ила. Азотистая кислота отмечена в придонном горизонте. Окисляемость 85 мг кислорода на 100 г сухого ила; содержание кислорода в воде высокое (90% насыщения). Влияние Сомынки на Москву-реку заметно по появлению в ней как органического вещества в период цветения Сомынки, так и азотистой кислоты, не говоря об организмах, заносимых из этого притока. Так же как Сомынка влияет на Москву-реку и Чаченка. Глубина Москвы-реки в 20—30 м от впадения Чаченки равна 3,5—4,5 м. Течение реки медленное. Дно песчаное, с небольшим количеством ила. Окисляемость = 8; кислорода не меньше 90% насыщения. Илы этого района Москвы-реки загрязнены актиномицетами больше, чем другие.

По материалам гидробиологической группы С. Н. Скадовского видно, что Сомынка несет фекальные загрязнения, Старица сносит в Москву-реку органические вещества вообще, а Чаченка, под влиянием дождей (ливней), может сильно ее загрязнить, внося всевозможные отбросы. Эти данные дают ясную картину отрицательного воздействия ближайших к Рублеву притоков и подсказывают те коренные мероприятия, в которых серьезно нуждается район, а микробиологу они

дают представление об условиях, в которых происходит развитие актиномицетов в обследованных водоемах.

Сильно загрязненные органическими веществами Сомынка, Чаченка и Старица представляют для развития микроорганизмов самые подходящие условия. Вода и, главное, илы заселены бактериями, плесневыми грибами и актиномицетами. Среди многочисленного населения илов развиваются группы организмов, вырабатывающие разнообразные пахучие продукты. В воде притоков и в самой Москва-реке найдены большие количества плесневых грибов (Е. С. Назарова), отнесенных к 40 родам. Некоторые из них выделяют пахучие вещества, присущие затхлой воде, таковы напр. Rhabdospora sp., а также некоторые виды Penicillium и Aspergillus. Среди бактерий можно, в свою очередь, обнаружить группы «пленчатых» бактерий, образующих землистые запахи. Из дальнейшего можно видеть, в каком значительном количестве среди живого населения донных отложений развиваются актиномицеты, организмы с наиболее, может быть, резко выраженной способностью образовать характерный землистый запах.

Количество бактерий в поверхностной воде названных притоков не держится постоянно даже приблизительно на одном уровне и меняется в зависимости от колебаний количества попадающих в него стоков и других источников, вносящих органические вещества и бактерии. Пробы воды в период исследования брались 2 раза в месяц (с августа по ноябрь 1939 г.), благодаря чему получились цифры, характеризующие количественный состав микроорганизмов в воде.

Количество бактерий в придонной воде, как правило, несколько выше, а некоторое представление о порядке чисел, с которыми приходится иметь дело при анализах воды притоков, можно получить из табл. 1.

Таблица 1

Сводная таблица средних чисел за период август — ноябрь 1939 г. (Число колоний на МПА в 1 см³ воды)

Водоем	Бактерии		Актиномицеты	
	поверхностные	придонные	поверхностные	придонные
Сомынка	12 514	16 051	134	33
Старица у Глухова	1 637	1 722	77	1
Старица у Архангельского	1 499	1 856	195	341
Чаченка	4 585		1,6	
Москва-река ниже Сомынки	1 496	1 839	0,5	12
Москва-река ниже Старицы	685	689	0	4
Москва-река ниже Чаченки	509	1 199	52	33

Совершенно другого порядка числа получаются (табл. 2) тогда, когда для микробиологического анализа взяты илы со дна водоемов, или, собственно говоря,— поверхностный их слой, в котором преимущественно происходит большинство биологических (аэробных) процессов, существенно влияющих на характер водоема.

Таким образом, илы, как это видно из табл. 2, содержат по сравнению с водой громадные количества микроорганизмов, среди которых актиномицеты занимают видное место.

Из воды и грунтов было выделено вообще 150 штаммов актиномицетов (А. А. Егорова), которые были отнесены к 21 видам, установленным по «Определителю лучистых грибков» (1941) Н. А. Красильниковым при его любезной помощи.

Таблица 2

Число микроорганизмов в 1 г воздушно-сухого ила при посеве на крахмально-аммиачный агар

Место взятия пробы	Общее число микроорганизмов	Бактерии	Плесневых грибы*	Актиномицеты
19/VIII 1940 г.				
р. Сомынка	950 000	783 334	50 000	116 666
» Старица	1 226 250	1 062 500	59 584	104 166
» Москва	9 975 683	9 890 318	48 780	36 585
10/X 1940 г.				
р. Чаченка	79 084 967	75 163 399	от 30 000 до 68 000	3 921 568
» Старица у Архангельского	91 620 112	60 035 866	от 127 000 до 1 114 130	31 564 246
» » у Глухова	71 634 615	49 759 615	от 82 000 до 960 000	21 875 000
» Москва у Старицы	14 523 809	11 904 762	476 190	2 142 857

* Примечание. Количество плесневых грибов в Чаченке и Старице дано с указанием колебаний за весь период исследования.

Таблица 3

Список найденных в обследованных водоемах актиномицетов

Actinomyces albus	Actinomyces viridichromogenes
» albidus	» niger
» albidoflavus	» nigrificans
» coelicolor	» ruber
» chromogenes	» odorifer
» glaucus	» putrificans
» griseus	» metanocyclus
» globosus	» cylindrosporus
» longisporus	» Halstedii
» Lipmanii	» globisporus

Развиваясь в илах притоков (особенно Сомынки и Старицы), они заносятся течениями в Москву-реку, где попадаются в воде, а частично оседая на дно, могут здесь развиваться, хотя, конечно, далеко не так, как в загрязненных притоках, где в зарослях водной растительности, в илах, богатых ее остатками, они развиваются пышно, покрывая своими нитями стебли Nuphar, водной гречихи и др.

Из приведенных в таблицах чисел, взятых из многих однородных анализов, совершенно очевидно, что главная масса микроорганизмов скопляется на дне водоема в его отложениях. Актиномицеты, какого бы они ни были первоначального происхождения (почвенного или водного), встречаются тут в громадных количествах, а благодаря небольшой глубине исследованных притоков можно наблюдать в них массами лежащие на дне беловато-желтоватые хлопья развивающихся актиномицетов. Их можно обнаружить не только на поверхности ила, но и в самом илу, в пробах его (монолитах), взятых с глубины 20 см; тут они заметны на растительных остатках и растительном детрите, образующем ил. Хотя число актиномицетов в глубине ила и меньше, чем на его поверхности, но все же не малое (табл. 4).

Несмотря на значительное количество актиномицетов в илах, число их в воде сравнительно весьма невелико (табл. 5), а во многих пробах воды их вообще не обнаружено. Для того же чтобы они попали со дна в поверхностные слои воды, нужны прежде всего внешние условия: паводки, ветры, ливни и тому подобные явления, сопровождающиеся перемешиванием воды и илов.

Наряду с актиномицетами водоемы, как это видно из таблицы, содержат довольно значительные количества зародышей плесневых гри-

Таблица 4

Количество микроорганизмов в 1 г сухого ила с глубины 20 см и с поверхности (на крахмально-аммиачном агаре) 3—6/XII 1940

Место взятия проб	Глубина	Общее число микроорганизмов	Бактерии	Плесневые грибы	Актиномицеты
р. Старица у Глухова, гл. 1,5 см	Поверхн. ил	5 849 056	4 716 981	566 037	566 038
	Ил на глуб. 20—25 см	2 493 263	1 617 251	202 158	673 854
р. Сомынка у детской санатории	Поверхн. ил	2 289 156	1 084 337	843 373	361 446
	Ил на глуб. 20—25 см	1 111 112	370 371	555 556	185 185
р. Сомынка у слияния с р. Серебрянкой	Поверхн. ил	1 295 033	844 594	394 133	56 306
	Глубина	1 625 000	1 250 000	187 500	187 500

Таблица 5

Количество микроорганизмов в воде и иле в одном и том же месте

Место взятия проб		Общее число	Бактерии	Плесневые грибы	Актиномицеты
Москва-река у Чаченки (27/VII)	Вода	11 300	11 000	200	100
	Ил	4 228 433	1 226 158	1 362 398	1 634 877
Москва-река у Старицы (10/X)	Вода	3 400	3 200	70	130
	Ил	14 523 809	11 904 762	476 190	2 142 857

бов, которые развиваются на средах Рейнкинга и на крахмально-аммиачном агаре при посевах водой и илом. Так, в Чаченке на 1 г сухого ила находилось от 20 270 до 75 480 плесневых грибов, в Сомынке до 170 720, но больше всего их оказалось в Старице под Архангельским, где меньше 127 680 колоний в культурах вообще не образовались, достигая 1 320 440 (в октябре). Столь высокие числа зависят от благоприятствующих для их развития условий: вследствие произрастания водной растительности, густо покрывающей дно водоема, от скопления на дне значительных количеств растительного детрита и медленного, спокойного течения. Среди плесневых грибов, определенных Назаровой, привлекают внимание 2 вида Penicillium 1, образующие сильно пахучие продукты. В илах Старицы под Глуховым на 1 г сухого ила обнаружено 540 170 колоний Penicillium, а под Архангельским — 681 710, т. е. количества большие, чем в унавоженной почве. Это грибное население Старицы проникает в Москву-реку, в илах которой после Старицы найдено 835 120 колоний плесневых грибов и в том числе 244 570 пахучих Penicillium, тогда как до впадения Старицы количество Penicillium не превышало 31 200 колоний. В воде плесневых грибов, так же как актиномицетов, несравненно меньше, но все же в некоторых пробах воды Москвы-реки, вероятно в связи с заносом детрита из Сомынки, количество их доходило до 11 800 колоний (август 1939 г.).

Общее количество микроорганизмов и отдельных их групп в водоемах имеет тенденцию к осени увеличиваться, что можно поставить в зависимость как от скопления в речках отмершего планктона и бентоса, так и от заносимых в реки в больших количествах падающих листьев наземной растительности.

Количество в воде растворимых органических веществ в этот период увеличивается: так например, в Чеченке количество растворимых углеводов при пересчете на глюкозу увеличилось с сентября на октябрь

с 12 мг до 39 мг, в Сомынке достигло 59,5 мг, а в Старице даже 63—76 мг на 1 л.

Все это создает, повторяю, благоприятные условия для развития и скопления микроорганизмов в притоках, откуда они с продуктами их жизнедеятельности заносятся в Москву-реку. Каждый из обследованных притоков, как уже высказывалось, представляет для развития микроорганизмов благоприятнейшие условия: Сомынка своими сточными водами, а Старица заросшим водной растительностью водоемом с медленным течением представляют настоящее Эльдорадо для развития в них животных и растительных организмов; оба эти притока по обилию микроорганизмов, по наиболее благоприятным условиям для их развития, должны обратить на себя внимание при выработке мер к улучшению водоснабжения района.

Как уже указывалось выше, актиномицеты совершенно свободно и быстро развиваются на дне водоемов, образуя хлопья, с отложением в них окиси железа.

Кроме произведенных за развитием актиномицетов наблюдений непосредственно в водоемах, были взяты высокие стеклянные цилиндры, наполненные в одних случаях водой из соответствующего водоема, а в других — той же водой, но простерилизованной. На дно таких цилиндров был положен стерилизованный ил слоем в 10—15 см толщины со слоем воды над ним в 50 см (приблизительная глубина Сомынки). Ил засевали культурой одного или нескольких актиномицетов из числа выделенных из ила. Развитие посева шло быстро, и обычно через 2—4 дня на поверхности ила появлялся хорошо заметный невооруженным глазом хлопьевидный налет, окрашенный в этих опытах в некоторых случаях в буровато-желтый цвет окисью железа[1]. Вместе с развитием в цилиндре актиномицетов вода во всех опытах постепенно приобретала хорошо ощутимый землистый запах. Пахла не только вода в самом цилиндре с актиномицетами, но и проба ее, взятая из него; таким образом в воду несомненно переходили вырабатываемые ими пахучие продукты.

Развиваясь сначала только на дне цилиндра, актиномицет (актиномицеты) постепенно распространяется по стенкам сосуда, образуя на них группы колоний. Необыкновенно быстрое развитие и распространение актиномицета в сосудах, наполненных водой, было выявлено в специально поставленном опыте, когда на дно цилиндра была укреплена стеклянная модель «растения», достигающая поверхности воды. При температуре 28—30° «стебли» и «листья» модели уже через двое суток покрылись большими свешивающимися хлопьями актиномицетов. Эти опыты не оставляли никаких сомнений в способности актиномицетов не только развиваться в водной среде с быстротой, превосходящей их развитие на твердых средах, но и образовать большие количества скопляющейся в илах органической массы. Развивающиеся под водой актиномицеты образуют споры, в чем можно убедиться: если, например, на предметное или покровное стекло, опущенное в воду, нанести мазки агара с мицелием или опустить на дно цилиндра чашечку Петри с агаром и сделанным на него посевом, то развившийся актиномицет образует споры под водой. Установить это было весьма необходимо, так как образование актиномицетами пахучих веществ связывалось обычно со стадией спорообразования [9].

Из описанных опытов и наблюдений можно заключить, что актиномицеты способны к водному образу жизни, проходят в воде полный цикл развития.

[1] Отложение окиси железа на поверхности Act. albus, Act. verrucosus и др. известно давно, но обращает внимание на себя то, что Комитет американского бактериологического общества отрицает это как не свойственное актиномицетам.

Следует еще упомянуть, что развитие актиномицетов может в опытах происходить при давлении 30 мм, т. е. при парциальном давлении кислорода, в 25,5 раза меньшем, чем при обычных условиях; таким образом, развитие их вполне возможно на дне обследованных притоков, обедненных кислородом, в которых они находятся не только в виде жизнеспособных зародышей, но могут развиваться и плодоносить, являясь настоящими водными организмами, подобными многим водным грибам. Развиваясь в водоемах с исключительной быстротой, они образуют пахучие продукты, переходящие в воду и придающие ей землистый или другой запах, что зависит от преобладания того или другого актиномицета из числа многих, населяющих придонные области, и наличия соответствующих условий. Переход в воду образуемых актиномицетами (да и другими микроорганизмами) пахучих продуктов стоит в известной связи с характером и свойствами грунта — водоема. Песчаный грунт, например, почти не аккумулирует пахучие вещества, и они полностью переходят в воду; илистые грунты сильнее задерживают их распространение, аккумулируя пахучие вещества и задерживая их распространение. Все эти явления можно наблюдать в цилиндрах с различными грунтами и убедиться, таким образом, в их закономерности, вытекающей из адсорбционных свойств грунтов водоемов.

Таким образом, на основании наблюдений и исследований, произведенных в природных условиях и затем полученных опытным путем, необходимо притти к заключению, что актиномицеты способны проходить полностью цикл развития в илах водоемов. Они могут развиваться при этом при пониженном количестве кислорода (25 раз) и образовать в этих условиях продукты, обладающие землистым запахом и придающие соответствующий запах и привкус воде водоема. В зависимости от характера грунта пахучие вещества легко могут переходить в воду (песчаный грунт) или же аккумулируются (илистыми) грунтами и не так легко переходят в воду. Переходу в воду пахучих веществ способствует перемешивание воды от ветров, паводков и тому подобных явлений, вызывая тем как бы «вспышку» запаха. Возможно также допустить, что изменение адсорбционных свойств береговых почв может благоприятствовать переходу образуемых актиномицетами в почвах пахучих веществ в воду водоемов. Для устранения перехода в воду пахучих веществ необходимо обратить внимание как на очистку водоемов от их загрязнения — фактора, способствующего развитию актиномицетов в водоемах,— так и на укрепление берегов, препятствуя тем смыву в воду актиномицетов и их продуктов из приречных почв.

Выводы

1. Впадающие в Москву-реку притоки Сомынка, Чаченка и Старица содержат значительное количество органических веществ, загрязнены фекальными водами (Сомынка) и являются источниками, способствующими загрязнению микроорганизмами воды Москвы-реки.

2. Донные отложения (илы) Москвы-реки и особенно ее притоков населены громадными количествами (миллионы) бактерий, плесневых грибов и актиномицетов.

3. Актиномицеты, размножающиеся в илах и сравнительно в незначительном количестве попадающие отсюда в воду, являются одним из наиболее важных факторов появления у воды Москвы-реки землистого запаха и привкуса.

4. Паводки, атмосферные осадки и ветры служат одной из причин, способствующей распространению землистого запаха из загрязненных притоков в воде Москвы-реки.

5. Число актиномицетов в притоках заметно увеличивается к концу

лета и осенью, что может быть поставлено в зависимость от увеличения в водоемах растительных остатков и растворимого органического вещества.

6. Осыпание береговых почв, так же как и вымывание из них актиномицетов, может влиять на увеличение их числа в донных отложениях водоемов.

7. В водоемах актиномицеты развиваются, приспособляясь к водному существованию, образуют споры и распространяются по водной растительности и растительным остаткам донных отложений, покрывая их мицелием.

8. Микробиологические анализы поверхностной воды без анализа донных отложений не дают даже приблизительного представления о количествах развивающихся в водоеме микроорганизмов, а следовательно, подобные анализы причину появления запаха в воде вынуждают переносить на береговые почвы.

9. Для предотвращения «вспышки» как бы неожиданного появления в воде запахов и привкусов необходимо применять меры, связанные с очисткой водоемов от растительных зарослей, укреплять берега и устранять фекальные и богатые органическими веществами сточные воды, поступающие в реки, доставляющие питьевую воду.

Институт микробиологии
Академии Наук СССР
Москва

Получено 7.VIII.1944

ЛИТЕРАТУРА

1. Егорова А. А. и Исаченко Б. Л. О причине появления в водоемах землистого запаха и привкуса. ДАН, 36, № 6, 1942.
2. Никитинский Я. Биологическое обследование реки Москва и ее больших притоков между городом Звенигородом и Рублевской насосной станцией. Москва, 1912.
3. Отчеты Института микробиологии АН СССР: 1) за время с 15/V по 15/XII 1937, 2) за 1939 г., 3) за 1940 и 4) Санитарный очерк 8 районов бассейна Москва-реки.
4. Путилина Н. Т. Актиномицеты, плесени и микробы воды и донных отложений р. Северный Донец. Микробиология, т. 9, вып. 7—8, стр. 702, 1940.
5. Рыбалкина А. В. О возможных причинах периодического появления землистого запаха в воде Москва-реки. Рефераты работ учреждений Отд. биол. наук АН СССР 1940—41 г.
6. Burger W. a. Thomas. Tastes and odors in the Delaware River. J. Am. Water Works Association, v. 26, No. 1, 1934.
7. Thaysen A. C. The origin of an earthy or muddy taint in fish. I. The nature and isolation of the taint. Ann. App. Biol., v. 23, p. 99, 1936.
8. Thaysen A. C. and Bentelow F. T. K. The origin of an earthy or muddy taint in fish. II. The effect on fish or the taint produced by an odoriferous species of Actinomyces. Ann. Appl. Biol., v. 23, p. 105, 1936.
9. Tempel Erna. Untersuchungen über die Variabilität der Actinomyceten. Arch. f. Mikrob., II, S. 40, 1931.

ACTINOMYCETES IN RESERVOIRS, AS ONE OF THE CAUSES RESPONSIBLE FOR THE EARTHY SMELL OF THEIR WATERS

B. Issatchenko and *A. Egorova*

Summary

1. The affluents of the Moscow-river, Somynka, Chachenka and Stariza contain considerable amounts of organic matter; some of them (Somynka) are contaminated with fecal sewerage. Their effect is thus to contaminate the waters of the Moscow-river with microorganisms.

2. The bottom deposits (silts) of the Moscow-river and especially of its tributaries are inhabited by huge numbers (millions) of bacterial moulds and actinomycetes.

3. Actinomycetes which multiply in the silts and get into water in relatively small quantities, constitute one of the most important agencies responsible for the earthy smell and unpleasant flavour of the Moscow-river water.

4. Overflows, atmospheric precipitations and winds do also contribute to the spreading of the earthy smell from the contaminated affluents to the Moscow-river.

5. By the end of summer and autumn the quantity of actinomycetes increases appreciably; this may be put down to the accumulation in the reservoirs of vegetable remains and of soluble organic matter.

6. The crumbling of the bank ground, as well as the washing out of the actinomycetes from the grounds may also increase their contents in the bottom deposits of the reservoirs.

7. In the reservoirs the actinomycetes multiply; having become adapted to the aquatic mode of life, they sporulate and spread throughout the water vegetation and vegetable remains contained in the bottom sediments, covering them with mycelium.

8. Microbiological analysis of surface water alone, without analyses of bottom sediments, fail to give any approximate idea of the amounts of microorganisms developing in the reservoirs. The cause of the appearance in the water of an earthy smell is thus necessarily put down to the bank grounds.

9. In order to prevent such «outbreaks» of smell and unpleasant flavours of the water in the reservoirs, it is necessary to have recourse to such measures as are connected with the cleering of reservoirs of any vegetable growth consolidation of the banks and elimination of fecal sewerages and sewerages rich in organic material, which have access to rivers supplying drinking water.

Institute of Microbiology of the
Academy of Sciences of the USSR
Moscow

ИЗУЧЕНИЕ МЕХАНИЗМА ЛИЗИСА

I. СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ ПРОЦЕССОВ ЛИЗИСА И АВТОЛИЗА У ACTINOMYCES ШТАММА МАХЛИНА

С. В. Горюнова

Процесс массового растворения клеток, или лизис, неоднократно наблюдался многими исследователями-микробиологами у различных видов микроорганизмов. Ряд авторов отмечает этот феномен в своих исследованиях.

Так, Much и Sartorius [18] и Schubert [20] наблюдали подобное явление у одного штамма B. mycoides. Cowles [11] обнаружил его у B. anthracis, B. subtilis и Clostridium tertium.

Gajzago [12] наблюдал автолиз культур холерного вибриона.

Dooren de Jong [14], Гамалея [2], Lominski [15] и Levis и Worley [16] отмечают аналогичные случаи для B. mycoides, B. megatherium. Smith и Jordan [21] подтвердили это для дифтерийной палочки, а Steenen [23] для микобактерий.

Wierig и Wibols [25] описали саморастворение культур у дрожжей; Sonnenschein [22] — у грибка Monilia.

У плесневидных грибов явление автолиза установили Вернер и Альтергот [1]. Последние, работая с Fusarium niveum Smith, часто наблюдали на определенных средах растворение мицелия. Микроскопирование в этих случаях не показывало наличия загрязнения, что говорит об иных причинах растворения гриба.

Дмитриев [3, 5, 6, 7] и Фирюкова [4], изучая актиномицет, выделенный ими из актиномикозных узлов человека, отмечают наличие лизиса в известный период смены форм культуры.

Наблюдения о наличии автолиза у актиномицетов мы встречаем и у других авторов, так:

Wierig и Wibols [25] наблюдали спонтанное растворение мицелия у Act. roseus, Act. bovis, Act. farcinicus и Act scabies. Исследователи полагают, что этот процесс может быть вызван наличием особого бактериофага.

Исследуя сапрофитные актиномицеты, Красильников [8] также неоднократно отмечает наличие спонтанного лизиса у этих грибков и на основании своих наблюдений приходит к тому выводу, что лизирующее вещество вырабатывается самими клетками актиномицета и выделяется наружу в момент их распада.

Лизирующий фактор, по его данным, обнаруживается в тот момент, когда развитие клеток приостанавливается. Сам литический процесс автор рассматривает как результат автолиза или самопереваривания клеток. Подобная точка зрения на процесс лизиса высказывается и целым рядом других авторов.

Мантейфель [10], изучая условия, способствующие и задерживающие автолиз ацетонобутиловых бактерий, предполагает, что основным фактором, обусловливающим это явление, является действие протеолитических ферментов, образуемых самими клетками в зависимости от состава и концентрации окружающей питательной среды.

Diehl [13] в своих статьях также высказывал предположение о том, что протеолитические энзимы не преформированы в клетке, а вырабатываются организмом в зависимости от среды.

Суждение о том, что бактериальный автолиз совершается под влиянием протеолитических ферментов, принадлежащих самим же клеткам, мы встречаем в литературе и у таких исследователей, как Malfitano [17], Orla-Jensen [19], Sturges и Rettger [24] и др.

Основываясь на предположении о возможной связи лизиса с автолизом, в частности с протеолизом, мы в данной работе поставили своей задачей экспериментальную проверку этого предположения.

Для работы по изучению механизма лизиса нам были рекомендованы Красильниковым три штамма актиномицетов: Махлина, Волкова и Булгакова. Их них нами был выбран штамм Махлина, имеющий более крупные колонии. Этот штамм лучше всего развивался при 37°. На мясо-пептонной среде лизис наблюдался на 3—4-й день. Выращивая актиномицеты при комнатной температуре, можно было наблюдать лизис на 5—6-й день. На агаровых пластинках данный штамм актиномицета образовывал довольно компактные, блестящие, бесцветные колонии. Образование спор как бы предохраняло колонии от наступления лизиса.

Лизис колоний можно было вызвать искусственно, перенося с агара колонии в дистиллированную воду или изотонический раствор Рингера при 55—60°. Полный лизис наблюдался в этом случае через 2 часа.

При выращивании же на среде Чапека колонии этого лучистого грибка образовывали обильный воздушный мицелий, были окрашены в темнобурый цвет (пигмент переходит в агаровую среду) и росли значительно медленнее. Спороношение к концу четвертых суток было полное — феномен лизиса отсутствовал.

Для культуры нами были испытаны и твердые и жидкие среды. Первоначально большее внимание было обращено на культивирование актиномицетов в жидких средах, из числа которых особенно хорошее развитие давал мясо-пептонный бульон. Но обычно материал, выращиваемый в таких условиях, получался очень неоднородный, так как одновременно с нарастанием новых колоний происходил и лизис старых. Следует здесь отметить также, что, в отличие от трехсуточных и старше, односуточные культуры не только в естественных условиях, но даже при повышении температуры до 55—60° не лизировались совсем, а двухсуточные — не нацело.

Кроме того, на жидких средах трудно было получить большую массу мицелия, что нам было особенно важно. При выращивании на МПА, напротив, можно было сравнительно легко накопить большое количество однородного материала, хотя отделить колонии актиномицета от агара не представлялось возможным.

Дальнейшие наши опыты по улучшению культивирования актиномицетов были направлены на то, чтобы не допустить непосредственного соприкосновения грибка с агаром, не нарушая, вместе с тем, поступления питательных веществ из среды в организм.

Наилучшие результаты получили с целлофаном. Колонии с него снимались скальпелем или шпателем очень легко, быстро и чисто. Довольно серьезным осложнением на первых этапах работы было то, что продажный целлофан оказался бактериально загрязненным и обычная стерилизация не давала возможности избавиться от инфекции микроба — типа сенной палочки. Применив перед стерилизацией промывку целлофана в разбавленной соляной кислоте, а затем в щелочи с последующей отмывкой в проточной воде, мы получили совершенно стерильный материал. Сравнение литического процесса с автолизом проводилось, в основном, путем изучения азотистых продуктов, получающихся

в результате этих процессов, выяснения отношения к pH среды, температуре и т. д.

Во избежание неясности и частого смешения понятия автолиза и лизиса необходимо внести теперь же некоторую ясность в эти определения и более строго их разграничить, не предрешая еще вопроса о том, насколько оба явления связаны между собой по существу.

Под автолизом мы понимаем процесс разнообразного действия протеолитических и иных ферментов в клетках, потерявших соответствующую им в нормальном состоянии регулировку управления, что наступает при понижении или прекращении жизненных функций клетки. Это наблюдается, например, в отсутствии питательной среды, под действием антисептиков, при отмирании, частичном или полном и т. п. Микроскопическая картина в таких случаях обычно такова: клетки сохраняют свои очертания; оболочка, как норма, остается целой. Под процессом лизиса, в отличие от автолиза, понимается невыясненный с механической и химической сторон процесс более или менее полного растворения всей клетки. Этот процесс наступает спонтанно, без всякого видимого наружного воздействия,— в частности, для актиномицетов медленно в естественных условиях, и быстро, в течение 2 часов, при помещении снятых с агара колоний в изотонический раствор при 55—60°.

В этом случае под микроскопом обнаруживаются только отдельные, весьма редкие незатронутые клетки, а в прозрачном растворе — минеральные скопления на дне.

В наших опытах мы проводили параллельно опыты с лизированным и автолизованным материалом; контролем являлись свежие культуры актиномицетов.

Для сравнения лизиса с автолизом по образующимся во время этих процессов азотистым продуктам прежде всего были определены в лизированном и автолизованном материале белковый и небелковый азот.

«Автолиз» проводился в следующих условиях: навеску около 3,5 г только что собранных свежих колоний трехсуточной культуры актиномицета растирали со стеклом и толуолом и помещали в 20 см³ изотонического раствора Рингера, прибавляя туда же 3 см³ толуола. Колбочку ставили в термостат при 37—38° на 20 часов.

Для проведения лизиса такую же навеску актиномицета, без растирания и толуола, помещали в 20 см³ изотонического раствора Рингера в термостат на 2 часа при 55—60°.

Для сравнения с исходным материалом третью такую же навеску растирали в ступке в течение 5 мин. и переносили в колбочку с 20 см³ раствора Рингера, немедленно смешав с 5 см³ 20% трихлоруксусной кислоты. В первых двух случаях белки осаждались таким же прибав-

Таблица 1

Определение белкового и небелкового азота в исходном материале и в материале после «лизиса» и «автолиза» в %

Материал	Опыт 13			Опыт 13a			Опыт 13b		
	А з о т								
	белковый	небелковый	общий	белковый	небелковый	общий	белковый	небелковый	общий
Исходный	5,5	3,86	9,36	6,07	3,06	9,13	4,75	2,42	7,17
Лизированный	2,13	8,54	10,67	1,41	9,11	10,52	1,26	6,64	7,9
Автолизованный . . .	1,4	9,45	10,85	0,75	9,05	9,8	0,72	6,83	7,35

чением 20% трихлоруксусной кислоты после лизиса и автолиза. В фильтрате и осадке определялся азот по Кьельдалю. Результаты определений представлены в табл. 1.

Из полученных данных видно, что в обоих процессах идет деградация белковых веществ и что «протеолиз» и «лизис» в этом отношении очень близки между собой. Можно думать, что как в первом, так и во втором случаях действуют одни и те же агенты — протеолитические ферменты.

Для изучения протеолитической активности ферментов, актиномицетов, нами были поставлены специальные опыты, где субстратом служил казеин, на который заставляли действовать, с одной стороны, полностью «лизированные» колонии, с другой стороны — колонии, подвергнутые «автолизу» с толуолом.

Методика опытов

Навеска свежесобранных колоний актиномицета в 25 см³ изотонического раствора (pH = 7,0) ставилась для вызывания «лизиса» на 2 часа в термостат при 55—60°. Через 2 часа в ту же колбу с полностью пролизированными колониями прибавлялось 0,5 г казеина и 1 см³ толуола. Колба ставилась в термостат на 24 часа при 37—38°. Через 24 часа прибавлялось 5 см° 20% трихлоруксусной кислоты для осаждения белков и инактивации ферментов. В контрольную колбу трихлоруксусная кислота приливалась сразу после лизиса до прибавления казеина. Осадки отфильтровывались, и фильтраты сжигались по Кьельдалю. Полученные значения для содержания азота в контрольных колбах вычитывались из таких же значений опытных колб. Разница должна была показать количество казеина, затронутого содержащимися в соответствующем материале протеолитическими ферментами.

Для получения автолизированного материала навеска свежесобранных и растертых со стеклянным порошком колоний актиномицета в 25 см³ изотонического раствора (pH = 7,0) с 3 см³ толуола ставились в термостат на 20 часов при 37—38°. Через 20 часов в колбу, в которой находились автолизованные, но в общем сохранившие внешние очертания колонии, прибавлялось 0,5 г казеина. Колба ставилась в термостат на 24 часа; прибавлялось 5 см³ трихлоруксусной кислоты для осаждения белков и инактивации ферментов.

В контрольную колбу, как и в случае лизированного материала, трихлоруксусная кислота приливалась после автолиза, но до прибавления казеина. Осадки отфильтровывались и фильтраты сжигались по Кьельдалю. Расчет протеолиза проводился как и для «лизированной пробы».

Для определения активности протеолитических ферментов в исходном материале — навеска свежесобранных колоний актиномицета, растертая со стеклянным порошком тотчас же с 25 см³ изотонического раствора (pH = 7.0), 1 см³ толуола и 0,5 г казеина, помещалась в термостат при 37—38°. Через 24 часа прибавлялось 5 см³ 20% трихлоруксусной кислоты. В контрольную колбу кислота добавлялась еще до прибавления казеина. Осадки отфильтровывались и сжигались по Кьельдалю.

Исходя из того, что при микроскопировании односуточных и двухсуточных культур исследуемого актиномицета обнаружить лизис не удается, мы провели в этой серии опытов определение активности у культур различного возраста. Полученные данные приведены в табл. 2.

Из приведенных цифр видно, что во всех трех случаях наименьшей протеолитической активностью обладает лизированный или подвергнутый условиям лизиса (одно- и двухсуточные культуры) материал. Создается впечатление, что в случае лизиса протеолитические ферменты

Таблица 2

Количество казеина в мг, переваренного за 24 часа навеской актиномицета, соответствующей 500 мг сухого веса

Материал	Культура трехсуточная		Культура двухсуточная		Культура односуточная
	опыт 5а	опыт Кв	опыт 22	опыт 22	
Исходный	1 654,2	1 637,22	1 279,0	1 125,1	968,2
Лизированный . . .	1 277,6	1 637,01	1 178,0	901,6	750,58
Автолизированный .	1 904,6	1 878,08	— 218,0	1 115,8	1 030,7

частично инактивируются. Отсюда возникло предположение — не могла ли сказаться на деятельности ферментов высокая оптимальная температура в условии опыта (55—60°). Поэтому приведенный цифровой материал не мог быть использован для оценки активности происходящих во время автолиза протеолитических процессов. Для того чтобы уравнять влияние высокой температуры, применявшейся во время лизиса в опытах с автолизованным и исходным материалами, температура была поднята до такого же предела и на то же самое время, как и при лизисе [1].

Чтобы вместе с тем до некоторой степени отделить действие извлекаемых водой протеолитических ферментов от действия, возможно, иного отличающегося по своей растворимости активного начала лизиса и чтобы заставить действовать на казеин первые без одновременно и тут же идущего процесса лизиса, мы растирали одну порцию свежесобранных колоний актиномицета и подвергали ее экстрагированию изотоническим раствором с толуолом при комнатной температуре в течение 2 часов. Экстракт и извлеченный остаток с новыми 25 см³ изотонического раствора ставили до прибавления казеина отдельно в термостат на 2 часа при 55—60°.

Лизис остатка происходил обычным путем, из чего было видно, что предварительное экстрагирование не оказало заметного влияния на этот процесс и что лизирующее начало осталось сохраненным в твердом остатке.

Другая порция материала (обозначается далее как автолизованный материал) помещается в термостат на 55—60° на 2 часа, целиком, но только после 20-часового автолиза с толуолом растертого со стеклом материала. И здесь явление лизиса при этой температуре происходило обычным образом, т. е. предшествовавший автолиз не повредил лизирующего начала, несмотря на присутствие толуола. Вместе с тем толуол не препятствовал нормальному протеканию лизиса.

Третья опытная проба подвергалась непосредственному лизису в вышеописанных условиях и пускалась в опыт переваривания с казеином после выдерживания «автолизованного» материала в течение 20 часов. Таким образом, температурные условия, в которых находились все три порции, были, по возможности, выправлены, и поэтому отпадало возражение о неравенстве ослабляющего действия температуры.

Ко всем четырем опытам и четырем контрольным пробам (в виде вытяжки и в виде извлеченного остатка) было прибавлено по 0,5 г казеина и 3 см³ толуола, после чего колбы были поставлены в термостат при 38—39° на 24 часа, затем следовало осаждение белков трихлоруксусной кислотой, отделение осадков и определение азота по Кьельдалю в фильтрате.

[1] Избрать другой путь, а именно — проведение лизиса более длительное время, зато при низкой температуре, мы не смогли, так как из-за большого количества материала мы не смогли обеспечить его стерильность.

Вычисление активности протеолиза производили вышеописанным порядком, с учетом тех изменений, которые происходили с самым опытным материалом в контрольных пробах без казеина, путем вычета соответствующих значений для контрольных колб, полученных для опытных проб с казеином. Результаты этой серии опытов приведены в табл. 3.

Таблица 3

Количество казеина в мг, переваренного за 24 часа навеской актиномицета, соответствующей 500 мг сухого веса

Материал	Культура трехсуточная				Культура двухсуточная	
	опыт 18a		опыт 18b		опыт 24	
Экстракт исходного . . .	1 050,6	1 845,3	1 052,0	1 844,3	461,9	896,9
Извлеченный остаток . .	794,7		792,3		435,0	
Лизированный	1 040,2		1 118,1		807,7	
Автолизованный	786,8		786		1 095,9	

Анализируя полученные данные, мы можем констатировать, что после выдерживания «автолизованного» материала в течение 2 часов при температуре 55—60°, т. е. при сочетании «автолиза» и «лизиса», мы наблюдаем у трехсуточной культуры (опыт 18a и 18b) еще большую инактивацию фермента, чем в случае одного «лизиса».

Выдерживание же исходного материала в течение 2 часов при 55—60° (отдельно экстракта и извлеченного остатка), наоборот, в сумме дает нам как будто бы не только сохранение протеолитической активности, но даже некоторое ее повышение, несмотря на то, что лизис остатка происходил обычным путем.

Полученным результатам можно дать следующее объяснение: поскольку лизис колоний актиномицета штамма Махлина начинается при нормальных условиях (37°) на четвертый или третий день, то очевидно, что только к этому сроку в клетках происходит накопление литического начала. Культура трехсуточная, по существу находящаяся на грани перехода в стадию лизиса, очевидно содержит «литическое начало» уже в таком количестве, что при оптимальных условиях его действия (60°) способна лизироваться полностью (чего мы не наблюдаем у культуры двухсуточной). Эта способность трехсуточной культуры лизироваться при 55—60° особенно отчетливо видна из последнего опыта, т. е. при сочетании «автолиза» и «лизиса», где, несмотря на предварительный процесс «автолиза» и присутствие толуола, «лизис» происходит обычным порядком.

Причина же сохранения протеолитической активности у исходного материала (сумма экстракта и остатка) для нас пока не ясна и для выяснения ее необходимо в дальнейшем провести ряд исследований.

Между тем интересно здесь же отметить те данные, которые мы получили при определении редуцирующих веществ, сравнивая эти два процесса [1].

Так, в исходном материале их содержится — 14 мг, в «лизированном» — 16 мг, в «автолизованном» — 56 мг.

Как видно из вышеприведенных цифр, гидролиз сложных полисахаридов в клетке актиномицета происходит только в последнем случае, а

[1] Методика подготовки материала полностью совпадает с той, которая описана выше для определения азотистых продуктов, возникающих в результате этих процессов.

именно — при «автолизе». А это опять-таки является лишним доказательством того, что эти два явления все-таки не аналогичны друг другу.

Зная, также, что реакция среды не безразлична для протекания этого явления (лизиса), так как Красильниковым и Кореняко [9] было уже установлено, что с наибольшей эффективностью этот процесс проходит при pH = 7,75 и слабее при pH = 6,5 или 8,0, следующим этапом нашей работы было изучение влияния pH в среде. В этих опытах pH устанавливался посредством фосфатных или цитратных буферов.

При этом для проведения автолиза, как и всегда, свежесобранные колонии актиномицета, растертые со стеклянным порошком, помещались в раствор с соответствующим значением pH, затем прибавлялся толуол и колбы выдерживались при температуре 37—38° в течение 20 часов. Критерием служило непосредственное наблюдение над видом опытных проб.

Для проведения лизиса свежесобранные колонии актиномицета помещались с соответствующим значением pH и ставились на 2 часа в термостат при 55—60°. Оценка, как и в первом случае, производилась только по внешнему виду. Параллельное протекание обоих процессов представлено в табл. 4.

Таблица 4

Значение pH	Культура трехсуточная		Культура двухсуточная		Культура односуточная	
	лизис	автолиз	лизис	автолиз	лизис	автолиз
2,0	Идет слабо	Нет	Идет слабо	Нет	Нет	Нет
2,5	Идет	»	» »	»	»	»
3,0	»	»	» »	»	»	»
3,5	»	»	» »	»	»	»
4,0	»	»	» »	»	»	»
4,5	»	»	Идет значительно медленнее, чем у трехсуточной культуры	»	»	»
5,0	»	Идет слабо		Идет слабо	»	»
5,5	»	Идет		Идет	»	Идет слабо
6,0	»	»		»	»	Идет
6,5	»	Оптимум		Оптимум	»	»
7,0	»	Идет хорошо	То же	Идет хорошо	»	Оптимум
7,5	Оптимум	То же	Лизиса почти нет	То же	»	Идет хорошо
8,0	Идет слабо	» »		» »	»	То же

Такое резко отличное отношение к pH среды, которое мы здесь наблюдаем, еще лишний раз убеждает нас в том, что «автолиз» и «лизис» в действительности не являются тождественными процессами и, выставляя далеко не одинаковые требования к окружающей среде, управляются, очевидно, не совпадающими полностью механизмами.

Результаты вышеописанных опытов побудили нас более тщательно заняться изучением значения питательной среды в этом сложном процессе, хотя кое-какие предварительные сведения в этом отношении нам уже были известны благодаря работам Дмитриева и Красильникова.

Так, согласно данным Дмитриева [3], автолиз актиномицетов значительно быстрее и полнее происходит на мясо-пептонном агаре, чем в бульоне. То же подтверждают Красильников и Кореняко. Последние, кроме того, провели обширные исследования по влиянию различных источников питания на этот процесс и выяснили, что лизис лучистых грибков с наибольшей эффективностью происходит на обычном мясо-пептонном агаре, слабее на пептонном и мясном и очень слабо на картофельном. В жидких средах лизис идет слабее и медленнее. Синтетические среды дают отрицательный результат.

Эти указания и наши данные, полученные при сравнении «лизиса» и «автолиза», наталкивали нас на мысль о том, что «литический» процесс, идущий в основном только по линии расщепления сложных белковых комплексов и не затрагивающий углеводной части организма, может обусловливаться влиянием различных источников азотистого питания.

Для выяснения способности актиномицета использовать азот различных органических и минеральных соединений нами был подобран следующий ряд азотсодержащих веществ: 1. Аминокислоты различного строения, 2. Аммонийные соли, 3. Нативные белки, 4. Пептон.

Было решено также проверить и ряд источников углеродного питания.

Изучение влияния различных аминокислот, как источников азотистого питания, на рост актиномицета было поставлено нами с целью выяснения специфичности поведения отдельных аминокислот и степени необходимости присутствия их в питательной среде для развития данного штамма.

Опыты проводились как с жидкой средой, так и на агаре. За основу была взята видоизмененная среда Чапека (0,5 г KCl; 0,5 г $MgSO_4$; 1,0 г K_2HPO_4; 0,01 г $FeSO_4$; глюкоза 3% или глицерин 10%).

Во время развития лучистого грибка в жидкой среде проводилось систематическое определение pH. При работе с нативными белками и пептоном стерилизация проводилась путем фильтрации через зейтцевские фильтры. Профильтрованный белок стерильно смешивался с расплавленным агаром и тут же разливался в чашки Петри. Прибавление хлористого натрия к препаратам некоторых белков было вызвано тем, что последние могут растворяться только в растворах нейтральных солей и в таком виде пропускаться через фильтр.

Все испробованные белковые препараты принадлежали фирме Кальбаум, за исключением мясного альбумина и глобулина, которые были получены в нашей лаборатории. Для выяснения степени усвояемости других групп веществ, как источников азотистого питания, мы, наряду с изучением органических соединений азота, проводили также испытания аммонийных солей.

В результате этих исследований выяснилось, что большинство аминокислот, примененных в опыте (гликококкол, аспарагин, глютаминовая кислота, тирозин, триптофан, аланин), могут служить источником азотистого питания для актиномицета штамма Махлина — исключение составляют цистин и лизин. Как правило, во время роста лучистого грибка наблюдается подкисление среды, исключение составляют аспарагин и триптофан (с глицерином), с которыми, наоборот, происходит подщелачивание, что, в свою очередь, может быть, объясняет и более нормальный рост актиномицета на агаре с аспарагином по сравнению с другими аминокислотами. В жидких средах рост значительно сильнее, чем на твердых. Амплитуда pH для роста грибка очень велика — от 3,5 до 8,0. (Опыты с более низким или более высоким pH, чем здесь указано, не проводились.)

Аммонийные соли являются лучшими источниками азотистого питания, чем многие аминокислоты. Но явление лизиса актиномицетов на мясо-пептонном, мясном и пептонном (неочищенном) агаре совершенно не зависит от азотистого питания. Применение в данных опытах различных источников азота показывает, что данный штамм в отношении усвоений последнего является чрезвычайно гибким и может не только усваивать неорганический азот, но и брать его из соединений, где он связан амидной или имидной связью (аминокислоты), способен разрушать также и полипептиды, иллюстрируя это своим прекрасным ростом на чистых препаратах белков и пептона. При этом интересно отметить, что, помещая колонии грибка, снятые с этих сред, в изотоническом

растворе на 2 часа в термостат при 55—60°, лизис их вызвать не удается.

Опыты с различными источниками углеродного питания, как и следовало ожидать, не внесли ничего нового в наши познания относительно этого процесса. Во всяком случае, все это только заставляет предполагать, что явление лизиса на мясо-пептонном, мясном и пептонном агаре не связано с основными группами веществ среды, как белок, углеводы, а с присутствием какого-то иного вещества, попадающего в среду из мяса. Поэтому все дальнейшие наши изыскания и были направлены в сторону их поисков. Первоначально нам хотелось не прибегать к такой громоздкой работе, как изучение состава МПА, а попытаться нащупать это вещество путем добавления к синтетическим средам таких редких, но, вместе с тем, и необходимых веществ для живого организма, как гормоны или витамины, но поставленные опыты с тем небольшим выбором подобных соединений, который имелся в нашем распоряжении, ничего существенного не показали.

Поэтому мы, работая с мясным порошком, приготовленным по способу инженера Невежина, и со свежим мясом, перед приготовлением среды проводили следующую обработку этого материала. Как мясной порошок, так и свежеприготовленное мясо (измельченное в мясорубке) подвергались экстракции такими веществами, как спирт, эфир и ацетон. Оказалось, что вещество, действующее каким-то образом на процесс лизиса актиномицета, растворимо только в воде. Оно способно также адсорбироваться древесным углем, норитом и инфузорной землей. При диализе оно вымывается из коллодийного мешочка, и среды, приготовленные из внутреннего и отдельно внешнего содержимого коллоидной гильзы, а также и из их смеси после диализации, дают лизис только в двух последних случаях. Это последнее обстоятельство дает нам повод предполагать, что это вещество кристаллоидной природы.

Одновременно с этими работами мы проводили изучение свойств самого литического начала актиномицетов. О его строгой специфичности нам было уже известно. Так, испытания [9] активного фильтрата, полученного из Act. albicans штамма Махлина, на разные виды актиномицетов, проактиномицетов и микобактерий (всего было 350 культур) дало во всех случаях отрицательные результаты.

Полное отсутствие лизиса (при микроскопировании) одно- и двухсуточных культур побудило нас поставить ряд опытов по изучению действия лизата на культуры молодого возраста. Под термином «лизат» мы подразумеваем полностью растворенные колонии трехсуточной культуры актиномицетов в растворе Рингера, отделенные от выделившегося минерального остатка фильтрованием.

Опыты должны были выяснить, представляет ли лизис теснейшим образом связанное и неотъемлемое от клеток явление или же он производится каким-то действующим началом, которое способно проявлять свою литическую активность и вне той клетки, в которой оно образовалось, но и по отношению к объекту, не обладающему собственными лизирующими свойствами. Таким объектом должны были служить живые молодые или мертвые культуры этого же штамма всякого возраста, т. е. такие, которые сами по себе не лизируются ни в естественных, ни в искусственных условиях.

Нами исследовалось действие лизата на односуточную живую и прокипяченную и промытую трехсуточную культуру этого же штамма при различном pH (табл. 5).

Отсюда мы видим, что именно присутствие или отсутствие «лизирующего начала», а не состояние белковых и прочих веществ в клетке определяет способность или неспособность к лизису. А так как протеолитические ферменты в клетке актиномицета имеются уже с самого

Таблица 5

Значение pH	Односуточная живая культура	Прокипяченная и промытая трехсуточная культура
2,0	Лизис идет очень медленно	Лизис идет очень медленно
3,0	» » »	» » »
4,0	Лизис идет	Лизис идет
5,0	Лизис идет хорошо	Лизис идет хорошо
6,0	» » »	» » »
7,0	» » »	» » »
8,0	Лизис идет медленно	» » »

начала их существования, поэтому совершенно естественным является заключение, что «лизирующее» начало образуется вновь. Приведенные только что данные снова показывают несовпадение начала лизиса с началом автолиза при растущих значениях pH среды.

Действие «лизата» на мертвую трехсуточную и живую односуточную культуры явилось предпосылкой для постановки опыта с диализированием «лизата» и последующим изучением действия диализирующихся и недиализирующихся частей его на мертвую культуру.

Для этих опытов свежесобранные колонии актиномицета подвергались лизису при обычных уже вышеописанных условиях; полученный лизат был слит в мешочки из коллодиума; мешочек помещался в высокий, узкий сосуд, закрывавшийся пробкой. В качестве антисептиков в пробирку (сосуд) и в мешочек прибавлялись хлороформ и толуол. Через 3 суток мешочек вынимался из пробирки и отмывался в течение 4 суток сначала проточной водой, а затем дистиллированной. После этого мы действовали на прокипяченную и промытую трехсуточную культуру актиномицета жидкостью из мешочка, жидкостью из внешней среды и смесью обеих этих жидкостей. Лизис проходил только в последнем случае. Опыты проводились нами четыре раза и каждый раз давали одинаковый результат. Это позволяет уже сделать новые заключения о лизирующем начале: совершенно очевидно, что в процессе диализа «литическое начало» делится на два компонента, из которых каждый в отдельности не обладает литической активностью. Таким образом, лизирующее начало является двойственным по своему существу. Мы имеем здесь полную аналогию того, что давно известно для ряда ферментов, когда тем же путем, каким шли и мы, их удавалось разделить на кофермент и апофермент. Выяснение роли и природы обеих составных частей «литического начала» — дело нашего дальнейшего исследования.

Выводы

1. При обоих процессах, т. е. при лизисе и автолизе, идет деградация белковых веществ.

2. Но поскольку «лизированный» или подвергнутый условиям «лизиса» материал обладает меньшей протеолитической активностью по сравнению с «автолизованным» и исходным и протекает с большей эффективностью при других значениях pH, чем «автолиз»,— можно предполагать, что эти процессы управляются различными механизмами и что расщепление белковых веществ может быть следствием процесса автолиза, только сопровождающего лизис, но не обусловливающего его.

3. Изучение действия «лизиса» на объекты, не обладающие собственными литическими свойствами (односуточная и мертвые культуры), приводит нас к заключению, что лизис не является тесно связанным и неотделимым от клеток явлением, а производится каким-то действующим началом, которое способно проявить свою литическую активность

и вне той клетки, где оно образовалось, что только присутствием или отсутствием литического начала, а не состоянием белковых веществ определяется способность или неспособность клетки к лизису. Но так как протеолитические ферменты клетки имеются уж с самого начала ее существования, то естественно предположить, что лизирующее вещество образуется вновь. При этом с ростом и развитием клетки происходит его накопление до определенного предела, после которого наступает массовое саморастворение клетки.

4. Опыты с диализированием «лизата» и последующим изучением действия диализирующихся и недиализирующихся частей его на мертвую культуру позволяют нам сделать уже совершенно определенные выводы о двойственной природе литического начала, так как нам в наших опытах удалось его разделить на два компонента, из которых каждый в отдельности не обладал литическими свойствами.

Таким образом, здесь мы имеем полную аналогию с тем, что уже известно для многих ферментов. Несомненно, что литический процесс является также процессом ферментативным.

5. Но для возникновения или, во всяком случае, мобилизации этого литического начала в питательной среде должно присутствовать определенное вещество, повидимому — кристаллоидной природы.

6. Влияние этого вещества, присутствующего в мясо-пептонной, мясной и пептонной средах, проявляется только при достижении культурой актиномицета определенного возраста (переход к спороношению).

7. Каково же его участие в этом процессе — нам пока не ясно.

Институт микробиологии
Академии Наук СССР
Москва

Получено 23.III.1944

ЛИТЕРАТУРА

1. Вернер А. и Альтергот В. ДАН СССР, т. XV, вып. 14, стр. 219, 1937.
2. Гамалея Н. Биологические процессы разрушения бактерий. Монография. Биомедгиз. 1934.
3. Дмитриев С. ЖМЭИ, т. XIII, вып. 2, стр. 289, 1934.
4. Дмитриев С. и Фирюкова М. Медицинская паразитология и паразитарные болезни, т. V, вып. 3, стр. 414, 1936.
5. Дмитриев С. То же, т. VIII, вып. 6, 1939.
6. Дмитриев С. То же, т. IX, вып. 1—2, 1940.
7. Дмитриев С. То же, т. IX, вып. 5, 1940.
8. Красильников Н. Микробиология, т. VII, вып. 6, 1938.
9. Красильников Н. и Кореняко А. Микробиология, т. VII, вып. 7, 1938.
10. Мантейфель А., Микробиология, т. X, вып. 3, стр. 292, 1941.
11. Cowles 8, J. Bact., v, 22, 119, 1931.
12. Gajzago D. Cbl. f. Bakt. I Abt. Bd. 121, S. 438, 1931.
13. Diehl H. J. of Inf. Dis., v. 24, p. 347, 1919.
14. Dooren de Jong Цит. по Н. Красильникову и А. Кореняко.
15. Lewis J. u. Worley G. J. Bact., v. 32, p. 195, 1936.
16. Lominski. Цит. по Н. Красильникову и А. Кореняко.
17. Malfitano G. C. R. Acad. Sci., t. 131, p. 295, 1900.
18. Much u. Sartorius. Цит. по Н. Красильникову, А. Кореняко.
19. Orla-Jensen. Maelkeribakteriologie, 3. Aufl., 1923.
20. Schubert J. Cbl. f. Bakt., 1. Abt., Bd. 108, S. 151, 1928.
21. Smith u. Jordan E. Biol. and Med., v. 3, p. 423, 1931.
22. Sonnenschein C. Cbl. f. Bakt., 1. Abt., Bd. 95, S. 257, 1925.
23. Steenen W. Proc. Soc. Exp. Biol. and Med., v. 33, p. 253, 1935.
24. Sturges a. Rettger, J. of Bact., v. VII, p. 551, 1922.
25. Wierig K. u. Wiebols G. Цит. по Н. Красильникову и А. Кореняко.

CONTRIBUTION TO THE STUDY OF THE MECHANISM OF LYSIS

S. Gorjunova

Summary

1. The two processes, *i. e.* lysis in autolysis, are accompanied by the deterioration of proteins,

2. However, inasmuch a «lysified» material, or one subjected to the conditions of «lysis» is endowed with a lower proteolytic activity, as compared to the «autolysed» and initial material, and the process of decay of the material is more efficient here and goes on at different pH values than in the case of «autolysis», the two processes may be supposed to be controlled by different mechanisms.

3. The study of the action of «lysate» upon objects deprived of lysogenous properties of their own, makes us conclude that lysis is due to some active principle which is able to display its activity also without the cell where it had been produced. Its accumulation is associated with the growth and development of the cell.

4. The process of lysis is undoubtedly of enzymic nature since experiments involving dialysis give a picture analogous to that obtained in the case of many of the enzymes.

5. The lysegenous principle cannot apear or be mobilized in a nutrien medium unless the latter contains a definite substance probably of crystalloid nature.

6. The influence of this substance, if it is present in a meat-peptone or in meat and peptone medium, does not become manifest until the actinomycetes culture has attained a definite age (is ready for sporulation).

Institute of Microbiology of the
Academy of Sciences of the USSR
Moscow

ИЗМЕНЧИВОСТЬ МОЛОЧНОКИСЛЫХ СТРЕПТОКОККОВ

М. Р. Гибшман

Наблюдения за изменчивостью молочнокислых стрептококков очень немногочисленны. В 1938 г. нам удавалось резко изменять направление биохимического процесса в культурах молочнокислых стрептококков путем воздействия на них высокими температурами и добавлением фтористых и сернистокислых солей натрия, причем культуры или теряли, или приобретали способность к образованию летучих кислот; кроме того, мы неоднократно наблюдали случаи спонтанного изменения свойств культур; последнее не может обеспечить стандартизацию выпускаемой продукции.

Поэтому в настоящей работе мы пытались выяснить, все ли представители Str. lactis, Str. cremoris, Str. citrovorus, Str. paracitrovorus, являются стойкими и пригодными для приготовления заквасок и влияют ли на изменчивость молочнокислых стрептококков различные методы культивирования их в лабораторных условиях и различные методы высушивания культур и процессы производства сыра [1].

При изучении изменчивости молочнокислых стрептококков мы считали необходимым производить все наблюдения лишь за теми культурами, которые выделены из одной клетки. Выделение производилось по неопубликованному методу, предложенному для данной работы Перфильевым и Гибшман. Всего было выделено 24 культуры: 7 культур Str. lactis, 2 — Str. cremoris, 4 — Str. paracitrovorus, 2 — Leuconostoc mesenterioides, 5 — с переходными свойствами между Str. lactis и цитровorусами (в дальнейшем их будем именовать «переходными»), 2 — Str. thermophilus, 1 — Str. liquefaciens и 1 — Str. glycerinaceus.

Выделенные нами культуры были типичны по образованию летучих кислот, кислотообразованию в молоке, сбраживанию углеводов и отношению к температурам.

Так как стрептококки могут изменять свои свойства не только в зависимости от условий культивирования, но и в результате воздействия бактериофага, то все культуры, выделенные из одной клетки, периодически в течение трех месяцев проверялись на чувствительность к бактериофагу по методике, предложенной Яковлевым для Str. lactis и Str. cremoris. Все изучаемые культуры оказались нечувствительными к бактериофагу.

Sherman и Hussong [5, 6] а также Hunter [4] указывают, что отдельные штаммы, выделенные из лабораторных культур Str. cremoris, отличались друг от друга по кислотообразованию, сбраживанию углеводов, а также и по другим признакам. Мы имели дело с культурами, только что выделенными из одной клетки, поэтому штаммы (из одной культуры) сравнительно мало разнились между собой по энергии кислотообразования, продуцированию летучих кислот и т. д. Некоторая разница была отмечена в сбраживании углеводов на синтетической среде Орла-Иенсена с 0,5% пептона. Из 24 штаммов, выделенных из Str. lactis 78, 5 штаммов сбраживали сахарозу, а из 24 штам-

[1] Сушка культур, а также изготовление сыра проводились в осенний период (с половины августа до половины октября 1939 г.).

мов Str. cremoris 3 штамма сбраживали декстрин и мальтозу в отличие от исходной культуры. Несколько резче была разница между штаммами из одной культуры в отношении их к факторам роста. Было проверено влияние на стрептококки добавления к синтетической среде Орла-Иенсена 0,05—0,1% спиртового экстракта печени. Оказалось, что часть штаммов на этой среде утратила способность сбраживать лактозу и некоторые другие углеводы. Другие же штаммы, наоборот, сбраживали на среде с пептоном углеводы, которые не сбраживала исходная культура (табл. 1):

Таблица 1

Сбраживание углеводов на среде Орла-Иенсена с экстрактом печени 24 штаммами, выделенными из культуры (из одной клетки)

№ п/п.	Наименование культур	Из 24 штаммов сбраживают						Материнская культура не сбраживала
		лактозу	сахарозу	мальтозу	декстрин	арабинозу	ксилозу	
1	Str. lactis 78	24	5	24	24	—	—	Сахарозу
2	Str. lactis L.	23	14	21	17	—	—	
3	Str. cremoris 3/24 . .	10	8	3	3	—	—	Мальтозу сахарозу, декстрин
4	Str. cremoris 145 . .	0	2	—	0	—	—	Сахарозу
5	Str. paracitrovorus 116	23	23	—	1	—	—	Декстрин
6	» » » 18 .	8	0	—	1	—	—	Лактозу и декстрин
7	Переходная 152 . . .	24	0	—	20	—	—	
8	Str. glycerinaceus 53 .	24	11	24	9	—	—	Декстрин лишь затрагивала
9	L. mesenterioides 95 .	24	11	—	—	3	23	Арабинозу

В литературе имеются разногласия относительно влияния экстракта печени на молочнокислые стрептококки. Shnell, Strong и Peterson [7] считают, что спиртовой экстракт печени, который, по их данным, идентичен пантотеновой кислоте, активирует развитие Str. lactis и L. mesenterioides. Палладина [1] отмечает, что Str. lactis более требовательны к дополнительным факторам и спиртовой экстракт печени не активирует их развитие. Но экстракт активирует развитие Str. cremoris, который менее требователен в этом отношении. Мы полагали, что данный вопрос представляет некоторый интерес, и на нем следует остановиться.

Было проверено отношение к спиртовому экстракту печени 24 культур молочнокислых стрептококков, выделенных из одной клетки, и 19 культур, выделенных обычным методом из одной колонии.

Сбраживание 14 углеводов проверялось на трех средах: 1) синтетической среде Орла-Иенсена, 2) той же среде с добавлением 0,05—0,1% спиртового экстракта печени, 3) синтетической среде Орла-Иенсена с добавлением 0,5% пептона.

Результаты исследования показали, что все проверенные культуры не развивались на чистой синтетической среде с углеводами. Добавление же экстракта печени или пептона значительно активировало развитие культур.

Большинство проверенных культур Str. lactis (четырнадцать) активировалось добавлением экстракта печени и сбраживало углеводы с одинаковой силой на среде с пептоном и экстрактом печени. Четыре же культуры слабо реагировали на добавление экстракта печени и на этой среде сбраживали лишь часть характерных для них углеводов (меньшее количество, чем на среде с пептоном). Эту же закономерность мы отметили для культур Str. cremoris, Str. paracitrovorus и

L. mesenterioides, т. е. большинство из них активировалось добавлением экстракта печени, часть же на среде с экстрактом сбраживала меньшее количество углеводов, чем на среде с пептоном.

Культуры Str. liquefaciens и Str. glycerinaceus одинаково реагировали на добавление экстракта печени и пептона и с одинаковой силой сбраживали углеводы на той и другой средах.

На основании всего сказанного возможно отметить, что отношение к экстракту печени различно не только среди представителей, относящихся к одному виду, но и среди клеток (штаммов), выделенных из одной и той же культуры.

Изменчивость молочнокислых стрептококков в результате лабораторного культивирования, сушки культур и производства сыра

а) Изменчивость культур в результате лабораторного культивирования

Культуры, выделенные из одной клетки, перевивались в течение 5 месяцев в различные жидкие и твердые среды, обычно применяемые в лабораторной практике, а также среды с искусственно-измененным окислительно восстановительным потенциалом, в результате чего нам удалось применить несколько методов культивирования молочнокислых стрептококков в лабораторных условиях, обеспечивающих сохранение их первоначальных свойств. Но данный вопрос не имеет непосредственного отношения к нашей теме и поэтому на нем останавливаться не будем.

В большинстве случаев при перевивках мы наблюдали изменение культур в отношении сбраживания углеводов и лишь в двух случаях отметили отщепление от материнской культуры штаммов с резко отличавшимися свойствами,— на последних и остановимся.

Культура Str. paracitrovorus 116 (выделенная из одной клетки) не образовывала слизи в средах с сахарозой, не восстанавливала лакмуса, в молоке давала низкую кислотность (через 48 часов 39° Т), образовала довольно значительные количества летучих кислот и из углеводов сбраживала: глюкозу, лактозу, галактозу, левулезу, сахарозу и мальтозу.

В продолжение трех перевивок (два раза в месяц) на косом мясо-пептонном агаре с автолизатом и сахарозой (окислительно-восстановительный потенциал среды[1] $Eh_2 = 878$ мв) культура давала неслизистый штрих. При четвертой ее перевивке мы заметили (на четвертый день) появление сбоку штриха мелких слизистых колоний. Последующие перевивки постоянно производились из неслизистого участка штриха, но с каждой перевивкой отщепление слизистых колоний происходило все интенсивнее.

На других твердых средах, содержащих сахарозу, мы также отмечали отщепление от культуры Str. paracitrovorus 116 слизистых колоний, но немного позднее.

При длительных перевивках этой культуры на обычном мясо-пептонном или сывороточном агаре, т. е. на средах, не содержащих сахарозы, и высеве с этих сред на мясо-пептонный агар с сахарозой постоянно вырастали мелкие колонии, слегка слизистые. В данном случае никогда не наблюдалось отщепления крупных слизистых колоний.

Биохимическая характеристика этих культур (слизистых, слабослизистых и неслизистых) приведена в табл. 2.

[1] К агару добавляли 0,006 H_2O_2 и этим устанавливали высокий окислительно-восстановительный потенциал.

Таблица 2

Биохимическая характеристика штаммов Str. paracitrovorus 116, выделенных после культивирования на твердых средах

Наименование культур	Сбраживание углеводов. Кислотность выражена в 0,1% молочной кислоты					Биохимическая характеристика в молоке через 48 час.						
	лактоза	сахароза	декстрин	арабин	ксилоза	кислотность °Т	pH	летучие кислоты в литре дистиллата	диацетил	ацетоин	Реакция в лакмусном молоке	Примечание
Материнская культура . . .	0,9	0,9	0,0	0,0	0,3	39	5,7	24,5	0	0	Не востанавливает. иногда свертывает	Не свертывает молока
1. Не слизистый с косого агара *	0,18	0,5	0,7	0,3	0,5	—	—	—	—	—	То же	—
2. То же	0,0	0,18	0,18	—	2,16	77	5,6	35,0	0	0	» »	Не свертывает молока
3. » »	0,3	0,5	0	0	1,8	—	—	—	—	—	»	—
4. » »	0,7	0,7	0,18	0,3	1,26	82	4,7	40,0	0	0	» »	Тягучий слизистый сгусток
5. Слизистый с косого агара	0,7	0,18	0	0	1,08	57	6,1	36,5	0	0	» »	—
6. То же	0,7	0,18	0	0	1,26	—	—	—	—	—	» »	—
7. Сывороточный агар, слабое ослизнение	2,8	0	0,3	0,9	1,8	60	6,1	34,0	0	0	» »	Не свертывает молока
8. МПА слабое ослизнение .	0,3	1,26	0,3	0,9	1,26	100	4,4	40,5	0	0	» »	Свертывает молоко
9. То же	0,3	0	0	0,3	0,7	—	—	—	—	—	»	—

* Слизь образуется на среде с сахарозой
0 — слизь не образуется
— не производилось определения

При рассмотрении таблицы видим, что все выделенные штаммы не восстанавливали лакмуса, по образованию летучих кислот и кислотообразованию были более активными, чем материнская культура; штамм № 4 образовывал в молоке тягучий сгусток.

В отношении сбраживания углеводов отмечены следующие изменения: почти все штаммы приобрели способность активно сбраживать ксилозу и два штамма — арабинозу, но стали значительно слабее сбраживать лактозу и сахарозу (кроме двух).

Штаммы № 5 и № 6, отщепившиеся от Str. paracitrovorus 116 и начавшие образовывать слизь в средах с сахарозой и сбраживать пентозы, по всем признакам возможно было, судя по литературе, отнести к L. mesenterioides или к Betacoccus bovis (Орла-Иенсена). Штаммы № 2, 3 и 4, начавшие сбраживать ксилозу, но как исходная культура не образующие слизи в средах с сахарозой, следовало отнести к Str. paracitrovorus (по существующим классификациям).

Культуры Str. paracitrovorus, подобные последним, встречаются в природе и были выделены нами в 1938 г. из молока Смоленска и Уфы; они не образовывали слизи в средах с сахарозой, но активно сбраживали ксилозу. Штаммы, образующие мелкие слабослизистые колонии на мясо-пептонном агаре с сахарозой, являются, повидимому, промежуточными по своим свойствам между вышеуказанными двумя представителями, дающими слизистые и неслизистые колонии.

При длительных перевивках исследованных культур L. mesenterioides на косом мясо-пептонном агаре с сахарозой и измененным окислительно-восстановительным потенциалом [1] ($Eh_2 = 628$ мв) мы наблюдали появление в середине прозрачного слизистого штриха темной полосы, которая увеличивалась. Появление темной полосы в слизистом штрихе или темной «структуры» в слизистых колониях L. mesenterioides означает, по нашему мнению, ослабление их слизеобразующей способности. Культуры с подобной структурой постепенно становились слабыми слизеобразователями.

Остановимся на втором случае изменчивости стрептококков при культивировании на косом мясо-пептонном агаре с сахарозой и повышенным окислительно-восстановительным потенциалом ($Eh_2 = 878$ мв).

Переходная культура № 152 после одиннадцатой перевивки (2 раза в месяц) начала образовывать на косом агаре, кроме свойственных ей мелких, кремовых, плотных колоний, еще большие прозрачные и плоские колонии. При отвивке их в молоко были получены культуры, которые, в отличие от исходной культуры, не сбраживали лактозы, не свертывали молока и не восстанавливали лакмуса. Но вновь образовавшаяся культура была сходна с материнской по образованию летучих кислот и микроскопической картине (короткие цепочки и диплококки).

Кратко остановимся еще на одном наблюдении. При частых перевивках энергичных кислотообразователей (Str. lactis и Str. cremoris) в течение 5 месяцев в молоке (раз в 24 и 48 часов), а также на мясо-пептонный агар с молоком (раз в 2 недели), но не с сахарозой, мы постоянно наблюдали в культурах появление способности к энергичному сбраживанию сахарозы. Этого не происходило при перевивках культур в молоко раз в 10 дней или на твердой среде раз в месяц.

Повидимому, молоко при частых перевивках культур влияет на них подобным образом. Сам метод культивирования, например частота перевивок, может быть фактором, вызывающим изменчивость культур.

---

[1] Низкий окислительно-восстановительный потенциал в мясо-пептонном агаре устанавливался добавлением 0,01% сернистокислого натра.

б) Изменчивость культур под влиянием высушивания

Сушка культур, выделенных из одной клетки, производилась 1) при помощи высоких температур по методу, предложенному Скородумовой (45° в барабанной сушилке инженера Кукекова) и 2) крахмалом — обычный метод, применяемый в настоящее время (описан Скородумовой [2, 3]). Культуры сушились в заквасочной лаборатории НИМИ со всей тщательностью и под непосредственным руководством заведующей производством Рудометкиной (Хлебниковой), за что приносим ей и ее помощникам глубокую благодарность. Всего было высушено 8 культур (повторность для изменивших свойства — двухкратная). После сушки культуры хранились в течение двух месяцев при температурах 8—10°, 18—20° и 30°. Детально исследовались культуры в целом, а также штаммы, выделенные из них (по 24) после сушки и хранения.

Почти все исследованные культуры изменили свои свойства в отношении сбраживания углеводов. Все культуры после сушки (особенно жаром) стали более активными по кислотообразованию, чем исходные; кроме того, они стали образовывать довольно значительные количества ацетоина, спирта, эфиров и CO_2. Но резкое изменение в свойствах культур отмечено лишь в четырех случаях. После высушивания и хранения стрептококков в течение двух месяцев при 30° культура № 152 начала производить весьма большие количества летучих кислот (повысила с 7,0 до 46,0 — дистилляционные числа), а культуры L. mesenteroides 95, Str. paracitrovorus 116 и 18 потеряли способность к образованию летучих кислот. Более подробно остановимся только на одной, потому что, как увидим ниже, изменения, претерпеваемые культурами при сушке, варке сыра, под воздействием температур, хлористого кальция, сычуга и т. д., имеют один и тот же характер.

Было отмечено изменение в свойствах всех штаммов, выделенных из культур 152, 116 и 18. Повидимому это объясняется тем, что исследование культур производилось только после двухмесячного хранения их при 30°. При более раннем исследовании было бы, вероятно, отмечено изменение лишь у части штаммов. Подобной изменчивости молочнокислых стрептококков мы не наблюдали сразу после сушки или хранении их при температурах 10 и 20° (табл. 3).

При рассмотрении таблицы видим, что штаммы, выделенные из культуры Str. paracitrovorus 116, стали энергичными кислотообразова-

Таблица 3

Биохимическая характеристика штаммов, выделенных из сухой культуры Str. paracitrovorus 116 (без крахмала) после двухмесячного хранения при 30°

Штаммы	Кислотность °Т	pH	Летучие кислоты в 1 н дистилляте	Сбраживание углеводов (кислотность в 0,1% молочной кислоты)			Реакция в лакмусовом молоке
				лактоза	сахароза	декстрин	
Изменившие свойства 4	75	4,9	13,2	2,3	0	1,26	Свертывают и восстанавливают
10	80	4,9	9,0	2,16	1,44	1,08	
12	82	4,85	8,7	1,8	0,5	0,9	
18	85	4,9	9,4	2,7	0	1,8	
Материнская культура	39	5,7	24,5	0,9	0,5	—	Не восстанавливает, иногда свертывает

телями, восстанавливающими лакмус и производящими незначительные количества летучих кислот. Штамм № 4 образовывал несколько повышенные количества летучих кислот 13,2 (дистилляционное число [1]) и из углеводов сбраживал лактозу и декстрин, следовательно его возможно было отнести к «переходным» культурам. Штаммы № 10, 12 и 18 образовывали пониженные количества летучих кислот (в пределах 10,0 — дистилляционное число), свойственные энергичным кислотообразователям. Штаммы № 12 и 18 по сбраживанию углеводов и другим признакам можно было отнести к типичным Str. lactis; штамм 10 также можно было характеризовать как Str. lactis, хотя он сбраживал сахарозу, так как в литературе имеются указания, что Str. lactis могут сбраживать сахарозу.

Было выяснено, что добавление к молоку сычуга и хлористого кальция (что обычно практикуется для получения плотного сгустка при подготовке культур к высушиванию) вызывает изменения в свойствах цитроворусов и энергичных кислотообразователей (после пяти и шести перевивок). Первые под воздействием $CaCl_2$ приобретают большую энергию кислотообразования и могут превратиться в переходные культуры, вторые после перевивок в молоко с добавлением 0,1% стерильного сычуга (раствора, профильтрованного через свечу Зейтца) начинали образовывать повышенные количества летучих кислот, незначительное количество ацетоина и эфиров, попрежнему восстанавливали лакмус и свертывали молоко. Следовательно, образовавшуюся из Str. lactis культуру также можно было характеризовать как «переходную».

в) Изменчивость культур под влиянием процессов производства сыра

В 1919 г. Орла-Иенсен высказал предположение, что бактерии возможно изменяют свои свойства в процессе выработки сыра, приобретают определенные биохимические свойства и этим обусловливается специфичность сортов сыра. Мы наблюдали резкое изменение в свойствах культур при выработке сыра. Каждый сыр изготовлялся на отдельной культуре, выделенной из одной клетки. Всего было исследовано 7 культур и произведено 13 варок сыра. Повторность варок сыра — двухкратная. Наблюдения проводились в свежем сыре (после посолки) и после двух месяцев хранения в сырных подвалах.

При исследовании каждого сыра (свежего и двухмесячного) выделялось по 24 штамма, которые и изучались.

Сыр изготовлялся из стерильного молока в стеклянных колбах с добавлением на 1 л молока 1 г стерильного хлористого кальция и 100 мг стерильного сычуга (водный раствор сычуга, отфильтрованный через свечу Зейтца). Сыр вырабатывался по типу швейцарского, со вторым подогреванием до 56—58°. Вся аппаратура для прессования — серпянки, формы и т. д.— были стерильные. При изготовлении сыра культуры значительно изменили свои свойства в отношении сбраживания углеводов, а некоторые изменили и другие биохимические свойства. На них и остановимся подробнее.

Культура Str. cremoris $^{3}/_{24}$ была выделена нами из уфимского масла и при культивировании в течение двух лет при температуре 30° не утратила способности к образованию тягучего сгустка. При микроскопическом просмотре культура представляла собой длинные цепочки кокков. На мясо-пептонном агаре с дрожжевым автолизатом и сахарозой она образовывала крупные колонии.

[1] Количество летучих кислот выражалось в числе см³ 0,1 *N* NaOH, пошедшего на титрование 1 л дистиллята.

Таблица 4

Биохимическая характеристика штаммов, выделенных из свежего и двухмесячного сыров и изменивших свои свойства по сравнению с материнской культурой Str. cremoris 3 21 (Исследование через 24 часа)

Культуры		№ культур	Кислотность °Т	pH	Летучие кислоты в 1 л дистиллята	Ацетоин	Диацетил	Спирт в %	Эфиры в мг	CO_2	Сбраживание углеводов. Кислотность выражена в 0,1% молочной кислоты			Реакция в лакмусовом молоке
											лактоза	сахароза	декстрин	
Изменившие свойства	Не образуют тягучего сгустка в молоке	11св	85	4,9	26,6	Очень много	+	—	—	7,0	1,98	1,26	0,5	Свертывают молоко и восстанавливают лакмус
		8	74	4,8	15,0	++	0	0,1	6,2	2,5	1,26	0,5	0,7	
		11	74	4,7	15,0	++	0	0,06	—	3,5	1,26	0,3	1,26	
		22	80	4,9	16,0	++++	0	—	—	4,0	3,06	2,16	1,26	
Образуют тягучий сгусток в молоке		14	82	4,6	8,0	+	0	0	3,2	1,0	1,98	0,3	1,8	
		15	87	4,57	8,5	+	0	0	4,2	0,6	1,8	0,3	1,8	
Материнская культура		—	60	5,09	6,4	+++	0	0,01	0	—	1,1	0	0	

Штаммы Str. cremoris $^{3}/_{24}$, выделенные из сыров (свежего и двухмесячного), не были одинаковыми. Одни из них образовывали на мясопептонном агаре с автолизатом и сахарозой мелкие плотные кремовые колонии и в молоке давали тягучий сгусток. При микроскопическом просмотре штаммы представляли собой средние по длине цепочки кокков. Другие образовывали значительно более крупные колонии, похожие на материнские, но в молоке не давали тягучего сгустка и при микроскопическом просмотре представляли собой диплококки.

В табл. 4 приведена характеристика лишь части штаммов, выделенных из свежего и двухмесячного сыров.

Все штаммы были более энергичными кислотообразователями, чем материнская культура; из них штаммы, не образующие тягучести в молоке, были более слабыми по кислотообразованию, но приобрели способность к образованию повышенных количеств летучих кислот (26,6—15,0 в литре дистиллята), эфира и CO_2. Кроме того, они образовывали спирт (чего не наблюдалось в штаммах с тягучим сгустком) и большие количества ацетоина. По сбраживанию углеводов не было почти никакой разницы между этими двумя разновидностями (дающими тягучий и не тягучий сгусток в молоке). Они сбраживали лактозу, декстрин, и часть — сахарозу. Штаммы, получившие способность образовывать повышенные количества летучих кислот, возможно было отнести к «переходным» культурам. Штаммы Str. cremoris, не образующие летучих кислот, но из углеводов сбраживающие декстрин, возможно было отнести к Str. lactis, дающим тягучий сгусток в молоке — Str. lactis var. hollandiens.

Все штаммы Str. paracitrovorus, 18 и 116, выделенные из двухмесячного сыра (но не свежего), изменили свои свойства по сравнению с материнской культурой, причем характер изменения был тот же, что и при сушке культур, т. е. они превратились в энергичных кислотообразователей, восстанавливающих лакмус, но образующих повышенные количества летучих кислот (от 12,0 до 17,0 — дистилляционное число в литре перегона). Следовательно их возможно было отнести к переходным культурам.

Штаммы из двухмесячного сыра, выработанного на «переходной» культуре 152, которая потеряла способность к образованию летучих кислот в процессе лабораторного культивирования, вновь приобрели способность образовывать значительные количества летучих кислот (26,5—18,5—13,0), как и при сушке этой культуры.

Остановимся еще на штаммах, выделенных из двухмесячного сыра, выработанного на культуре L. mesenterioides 95.

Как и при сушке этой культуры, мы отмечаем в двухмесячном сыре, в отличие от материнской культуры, появление колоний, не дающих слизи на среде с сахарозой, лакмусовое молоко свертывающих и восстанавливающих и из углеводов — сбраживающих лактозу, сахарозу и декстрин и так же, как материнская культура, сбраживающих ксилозу.

Эти штаммы давали самые различные количества летучих кислот, а также продуцировали ацетоин, спирт, эфиры. Часть их возможно было характеризовать как Str. lactis, часть же являлась переходными.

Полученные результаты показывают, что в процессе изготовления сыра (свежий и после хранения) культуры резко изменяют свои свойства. Предполагаем, что сырная масса с происходящими в ней сложными химическими изменениями неизбежно должна вызывать изменчивость культур. Это, конечно, не значит, что они не будут иметь производственного значения.

На основании наших наблюдений возможно отметить: во-первых, что при образовании переходных форм последние по биохимическим свойствам имеют отдаленное сходство с исходной материнской куль-

турой, например при сушке L. mesenterioides отщепились штаммы, не образующие слизи в средах с сахарозой, не дающие летучих кислот. но, как и материнская культура, активно сбраживающих ксилозу и т. д.; во-вторых, что при возникновении переходных форм как у энергичных кислотообразователей, так и у группы цитроворусов мы встречаем штаммы, способные образовывать самые различные количества летучих кислот (6,0—10,0—12,0—15,0—18,0—26,0).

Кроме описанных случаев изменчивости культур при проведении работы мы наблюдали отщепление от культур Str. lactis штаммов с термофильными свойствами.

При сушке культуры Str. lactis 1, изготовлении на ней сыра и т. д. мы постоянно выделяли штаммы с различными свойствами (табл. 5).

Таблица 5

Изменение свойств Str. lactis 1 (Приобретение термофильных свойств)

№ п/п.	Наименование культур	Сбраживание углеводов. Кислотность выражена в 0,1% молочной кислоты						Кислотность через 24 часа при разных температурах в °Т				Реакция в лакмусовом молоке
		лактоза		сахароза		декстрин						
		Орла-Иенсен		Орла-Иенсен		Орла-Иенсен		20°	30°	38°	48°	
		+ пепт.	+ печ.	+ пепт.	+ печ.	+ пепт.	+ печ.					
1	Исходная культура 1	1,26	2,88	0,9	0	1,08	0,5	28	65	76	45	Восстанавливает Свертывает
2	4	1,26	2,6	0,7	0,18	1,44	0,18	26	60	64	36	»
3	9	1,26	2,6	1,08	0	1,6	1,08	38	54	64	40	»
4	7	1,8	2,38	1,26	0	0,7	0,7	22	45	96	104	Не восстанавливает Свертывает
5	5	1,8	2,16	1,26	2,32	0	0,3	20	50	96	100	»
6	6	1,8	2,52	1,98	1,98	0	0,3	22	50	100	100	»

Часть штаммов была сходна с исходной культурой, т. е. восстанавливала лакмус и имела оптимальную температуру около 30—38° через 24 часа.

Часть же штаммов имела иные свойства (данные приводим для трех); они перестали восстанавливать лакмус, температурный оптимум их стал выше — около 45° и из углеводов они сбраживали: на пептонной среде — лактозу, сахарозу и одна — слегка декстрин, а на синтетической среде с экстрактом печени все три активно сбраживали лактозу, две — сахарозу и одна — слегка декстрин.

Следовательно, при отщеплении от культуры Str. lactis штаммов с термофильными свойствами мы получили различные варианты по сбраживанию углеводов. По сбраживанию углеводов и температурному оптимуму отщепившиеся штаммы возможно было характеризовать как типичные Str. thermophilus, но они отличались от них по морфологическим признакам. В существующих классификациях указано, что культуры Str. thermophilus образуют в молоке короткие и длинные цепочки, в то время как стрептококки с термофильными свойствами, отщепив-

шиеся от Str. lactis I, при просмотре под микроскопом представляли отдельные кокки и диплококки.

При характеристике термофилов в классификациях отмечается, что лакмусовое молоко ими не восстанавливается или же восстанавливается частично.

На основании наших наблюдений можем отметить, что все исследованные 10 культур Str. thermophilus при 30° лакмусовое молоко свертывали, при 38° свертывали и частично восстанавливали, а при 45° свертывали и активно восстанавливали. Повидимому окислительно-восстановительный потенциал культур изменяется в зависимости от температуры сквашивания.

Суммируя кратко полученные результаты, следует указать, что при резкой изменчивости в свойствах молочнокислых стрептококков мы постоянно отмечали одну и ту же тенденцию. Представители группы citrovorus теряли способность к образованию летучих кислот и становились более энергичными кислотообразователями, причем часть образовавшихся штаммов можно было характеризовать как «переходные», а часть — как типичные Str. lactis. Энергичные кислотообразователи, наоборот, теряли свою активность и начинали образовывать повышенные количества летучих кислот, и их также можно было отнести к культурам с «переходными» свойствами.

Следовательно, переходные культуры могут образовываться как из группы citrovorus, так и Str. lactis и Srt. cremoris. Повидимому подобная изменчивость имеет место и в природе, так как из естественных молочных продуктов всегда можно выделить большое количество переходных культур. Представляется интересным вопрос о стойкости вновь образовавшихся штаммов.

Всего нами было получено 370 штаммов с резко измененными свойствами. Многие из них оказались одинаковыми, поэтому наблюдения в течение двух лет велись за 60 штаммами. Перед изучением они были 10 раз подряд проведены через чашки. Большинство вновь образовавшихся культур оказались устойчивыми вариантами и в течение двух лет не изменили своих свойств. Часть же культур (20%) потеряла вновь приобретенные признаки и возвратилась по своим свойствам почти к исходным культурам, отличаясь от них лишь способностью сбраживать углеводы. Таким образом, молочнокислые стрептококки могут резко изменять свои свойства под воздействием различных технологических процессов, и вновь образовавшиеся варианты во многих случаях являются стойкими.

В настоящей работе мы показали, как велико разнообразие в свойствах культур как энергичных кислотообразователей, так и цитроворусов. Мы также показали, что культуры способны изменять свои свойства, поэтому практически чрезвычайно важным является вопрос о том, какие же культуры мы должны отбирать для заквасок.

Считаем, что одной из основных задач микробиолога является отбор более устойчивых рас, и задача эта, в свете нашей работы, не может быть разрешена только комплексом определений биохимических свойств, устанавливающих принадлежности культур к тому или иному виду по Орла-Иенсену.

Единственно правильным путем, повидимому, будет установление стойкости отобранных культур, хотя бы в лабораторных условиях в течение нескольких перевивок. Затем следует определить нечувствительность культур к фагу, их нелизогенность, и лишь после этого культуры возможно допустить для использования в закваски. Королев в 1931 г. указал на необходимость отбора стойких рас.

В проведении экспериментальной части работы принимали участие Банникова и Дерябина.

Выводы

1. Резкая изменчивость 24 культур молочнокислых стрептококков была отмечена в процессе изготовления сыра, в сухих культурах после двух месяцев хранения при 30°, под воздействием $CaCl_2$ и сычужного фермента (профильтрованного через свечу Зейтца) и в нескольких случаях при культивировании стрептококков в лабораторных условиях на твердых средах с измененным окислительно-восстановительным потенциалом.

2. Изменчивость эта имела некоторую тенденцию: культуры Str. paracitrovorus, L. mesenterioides, Str. lactis и Str. cremoris способны были превращаться в «переходные» культуры, т. е. являющиеся одновременно энергичными кислотообразователями и в то же время образующими значительные количества летучих кислот и других побочных продуктов брожения,— следовательно переходные культуры (типа diacetylactis) могут образовываться из энергичных кислотообразователей и цитроворусов (при сушке культур, изготовлении сыра, под воздействием сычуга и хлористого кальция).

3. Культуры Str. paracitrovorus и L. mesenterioides способны превращаться в энергичных кислотообразователей, не дающих летучих кислот и по всем своим свойствам близких к Str. lactis.

Следовательно, возможно, что группа цитроворусов является одним из источников для образования культур со свойствами, близкими к Str. lactis.

4. Культуры Str. paracitrovorus способны отщеплять штаммы со свойствами Str. citrovorus и L. mesenterioides, а культуры L. mesenterioides могут терять слизистость. Поэтому считаем, что все три вида цитроворусов возможно признать вариантом одной разновидности (образующей летучие кислоты),— возможно, как указывал Хоккер, L. mesenterioides.

5. Культуры Str. lactis способны отщеплять штаммы с термофильными свойствами.

6. Культуры Str. cremoris приобретают способность к сбраживанию декстрина и мальтозы, тогда их возможно характеризовать как Str. lactis; когда же Str. lactis теряют способность к сбраживанию декстрина и мальтозы, тогда их следует отнести к Str. cremoris. Кроме того указанные культуры могут терять способность к сбраживанию лактозы.

7. Различные представители одного вида (Str. lactis, Str. cremoris, Str. paracitrovorus и т. д.) не одинаково относятся к пептону и экстракту печени; то же самое следует отметить относительно различных клеток одной и той же культуры. Это затрудняет дифференциацию видов.

8. На основании всего изложенного считаем, что молочнокислые стрептококки трудно разделить на четко очерченные виды, так как между видами (по классификации Орла-Иенсена) нет резких границ. Внутри каждого вида имеется бесконечное количество разновидностей и переходных культур между видами. Культуры, принадлежащие к определенному виду, в результате производственных процессов (сушка культур, варка сыра и т. д.) могут настолько резко изменять свои свойства, что их становится уже необходимым отнести к другому виду. В настоящее время мы считаем возможным виды молочнокислых стрептококков определить как разновидности, а дальнейшие исследования покажут их настоящее место в классификации. Группу citrovorus (Betacoccus Орла-Иенсена или Leuconostoc Хоккера) необходимо объединить в род Streptococcus.

Всесоюзный
Научно-исследовательский институт
молочной промышленности
г. Пушкин

Получено 16.VI.1941

ЛИТЕРАТУРА

1. Палладина С. К. Изменение молочнокислого брожения в зависимости от условий среды. Микробиология, т. VIII, вып. 6, стр. 733, 1939.
2. Скородумова А. М. Практическое руководство по технической микробиологии молочного дела. Сельхозгиз, 1933.
3. Скородумова А. М. Рационализация техники приготовления сухих культур молочнокислых бактерий. Молочная промышленность, № 11, стр. 7, 1936.
4. Hunter G. J. Examples or variation within pure cultures of Str. cremoris. J. of Dairy Research, v. 10, № 3, p. 464, 1939.
5. Hussong G. K. and Allen. The influence of conditions of culture and of different substrats and the characters of lactis acid streptococci. Ann. Cont. Soc. of Agr. Bact. Edinburg, 1937.
6. Sherman J. and Hussong K. Fermentative variability among substractions of Str. cremoris and Str. lactis obtained from pure cultures. J. Dairy Sci., No. 2, p. 101, 1937.
7. Shnell E., Strong F. and Peterson W. Growth factors for bacteria VIII Pantotenic and nicotinic acids essential factors for lactic and propionic acid bacteria. J. Bact., v. 38, No. 3, p. 293, 1939.

VARIATION OF LACTIC-ACID STREPTOCOCCI

M. Gibshman

Summary

The author considers that the lactic-acid streptococci can be hardly divided into clearly defined species as far as there are no exact limits between the species (according to the Orla-Jensen classification). Within every species there is an infinite quantity of varities and transitional cultures between the species. Cultures belonging to a definite species, having undergone some industrial processes (culture drying, cheese-making, etc.), may change their properties so considerably that they should be related to another species. At the present time we think it possible to define the species of lactic-acid streptococci as varieties; further investigations will show their due place in the classification. It is necessary to place the group of citrovorus (Betacoccus Orla-Jensen or Leuconostoc Hucker) into the Streptococcus species.

The All-Union Research Institute
of Dairy Industry
Pushkin City

ОБ АНАБИОЗЕ В ВЕЧНОЙ МЕРЗЛОТЕ ТЫСЯЧЕЛЕТНЕГО ВОЗРАСТА

А. Е. Крисс и *Н. А. Граве*

Огромное значение, которое представляет проблема длительности сохранения жизни в анабиотическом состоянии, определяет необходимость соответствующих исследований, и в особенности на материале вечной мерзлоты различного возрастного состава. Сама природа предлагает объект для наблюдений, невоспроизводимый в лабораторной обстановке,— какая другая возможность имеется у биолога, пытающегося выяснить границы анабиотической выживаемости существ во времени?

Первые эксперименты в данной области [1] привели к результатам, оспаривающим мнение Каптерева о способности разнообразнейших представителей микроорганизмов сохраняться тысячелетиями в состоянии анабиоза. Единичные находки бактерий относились к слоям грунта, залегающим в непосредственной близости к верхней границе мерзлоты, следовательно возраст этих участков был невелик.

Вскоре представился случай для новых исследований, описание которых и составляет содержание настоящей статьи.

Летом 1940 г. экспедиция Института мерзлотоведения им. В. А. Обручева Академии Наук СССР обследовала в Центральной Якутии обширные скопления ископаемого льда, заключенного в толщу вечномерзлых пород. В районе работ экспедиции, около озера Абалах, ископаемый лед залегает в виде довольно мощного (до 22 м) пласта среди подстилающих и покрывающих его пылеватых лессовидных суглинков, относимых по возрасту к четвертичным. Этот лед простирается на площади в несколько десятков квадратных километров.

Ископаемый лед довольно рыхлый, малопрозрачный, пресный, с большим количеством круглых воздушных пузырьков и с характерной тонкой слоистостью. Слоистость образована тонкими (до 1 мм) трещинами с прослоями пылеватого суглинка. Эти прослои иногда взаимно пересекаются и сливаются между собой. Грунтовые включения придают льду грязно-желтоватый цвет. При таянии лед распадается на отдельные гранулы диаметром до 0,4 мм, по форме напоминающие градины с плохо ограненными поверхностями. Структура ископаемого льда зернистая. Относительное развитие кристаллов изометрическое. Взаимная ориентировка кристаллов беспорядочная. Среднее количество газа, содержащегося в пузырьках 1 кг льда, можно считать для всей толщи равным 42,9 мл. Минерализация ископаемого льда достигает 0,22 г на 1 л воды, главным образом за счет гидрокарбонатов. В составе льда были найдены единичные экземпляры диатомовых — только бентические пресноводные формы. Большинство из них в хорошей сохранности, некоторые клетки — в делении, с остатками хроматофоров.

Имеются все основания считать [2], что ископаемый лед возник из обширных скоплений фирнизированного снега, покрывавшего древнюю поверхность рельефа. Снег, не успевая растаивать за лето, слеживался и постепенно превращался в лед. Впоследствии такой лед был погребен наносом пылеватого лессовидного суглинка и законсервирован вечной мерзлотой. Время образования описываемого ископаемого льда отно-

сится к ледниковой эпохе Сибири, и, следовательно, абсолютный возраст его нужно исчислять по меньшей мере десятками тысячелетий.

13 сентября 1940 г. в шурфе № 3 (рис. 1) на глубине между 9 и 10 м от дневной поверхности в горизонтальном направлении был сделан небольшой штрек, глубиной в 0,5 м и с площадью поперечного сечения 0,7 м². В этом штреке было сделано углубление по краям таким образом, что образовалась отточенная со всех сторон, кроме задней, ледяная болванка. Легко отбитая от своего основания, ледяная болванка представляла собой монолит льда в виде параллелепипеда со сторонами 16,5—12—11 см, объемом 2 179 см³ (рис. 2).

Монолит тут же был положен в деревянный ящик, облитый с внутренней стороны парафином. В этом ящике лед хранился в шурфе до наступления зимы; температура воздуха в шурфе, начиная с глубины 4—5 м от поверхности, все время была отри-

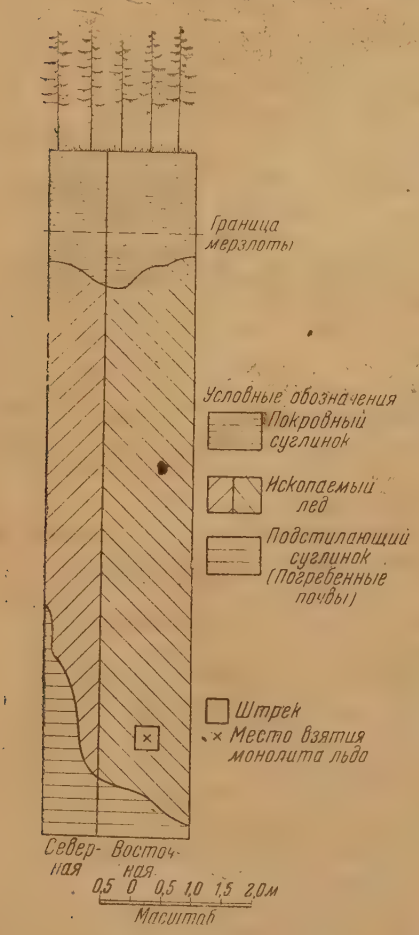

Рис. 1. Схематический разрез шурфа (северная и восточная стенки)

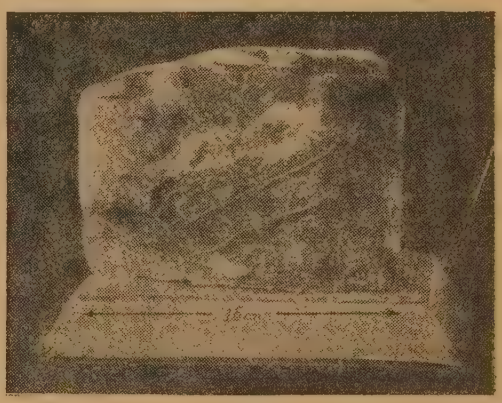

Рис. 2. Монолит ископаемого льда

цательная. В начале зимы ящик со льдом был перевезен на самолете в Якутск, а оттуда в январе в Москву. В Якутске, по дороге к поезду, в поезде (тамбур вагона) ящик находился в морозе. В Москве ящик со льдом был тотчас помещен в холодильную камеру Института мерзлотоведения и хранился там при температуре от —3° до —20°.

Предпринятые микробиологические исследования ставили своей целью определение наличия бактериального населения в монолите ископаемого льда, т. е. выяснение возможности оживления микроорганизмов.

Вопросы методики имели решающее значение, и поэтому особое внимание было уделено соответствующей подготовке помещения и конструированию прибора для резки монолита, чтобы в процессе работы исключить попадание микробов из водуха и из загрязненных наружных частей монолита.

Помещением для работы служила камера, в которой, благодаря холодильной установке, можно было поддерживать температуру до

— 25°. В этой камере был устроен небольшой бокс, обитый дерматином. Ежедневно, в течение 10 дней, при температуре +3° до +5° стены, потолок, пол и полки промывались сулемой 1 : 1 000. Этот же раствор распылялся в помещении бокса. Через полчаса бокс охлаждался до температуры —10°, —15°, затем температура повышалась до +8°, +9°, после чего камеру вновь охлаждали,— такая процедура повторялась несколько раз. Сменой замораживания и оттаивания в присутствии антисептика достигалась полная стерилизация бокса: открытые чашки Петри с питательной средой после часовой экспозиции оставались стерильными.

Для получения опытных образцов был сконструирован электрический ледорез (рис. 3), представлявший собой тонкую нихромовую проволоку (Φ = 0,5 мм), натянутую пружинками между двумя фарфоровыми ро-

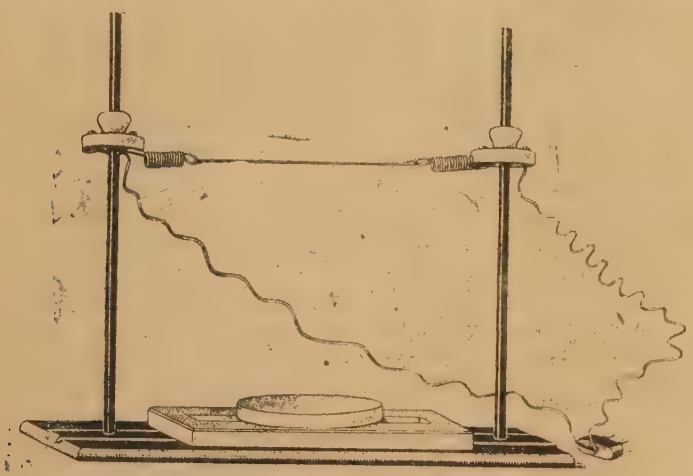

Рис. 3. Электрический ледорез

ликами, насаженными на стержнях металлических штативов. Ролики свободно скользили по стержням, и под действием силы тяжести этих роликов проволока, по которой пропускался электрический ток до накала, резала лед. Достоинством электроледореза было то, что при резке одновременно достигалась стерилизация граней образцов.

Ящик с монолитом был вскрыт в холодильной камере. При вскрытии оказалось, что поверхность монолита льда, начиная с момента взятия его из стенки шурфа, ни разу не подвергалась таянию: зернисто-пузыристое строение льда, хорошо заметное на свежем изломе, а также тонкие прослойки грунта не были нарушены или покрыты новообразованиями льда. Структура льда, рассмотренная под микроскопом, не носила следов изменения.

Все дальнейшие операции (7 марта 1941 г.) производились в боксе при температуре от —13° до —17°. Экспериментатор был облачен в глухо застегнутый стерильный халат; нос, рот, волосистая часть головы были закрыты маской, на руках — резиновые перчатки.

Из монолита было вырезано электроледорезом 13 опытных образцов: 6 наружных граней, затем 6 следующих, а последний — 13-й — представлял собой ядро монолита (рис. 4).

Опытные образцы помещались в стерильные банки, где происходило их оттаивание. Из талой жидкости производился высев в количестве 1—5 мл в серии элективных сред: мясо-пептонный бульон, мясо-пептонный агар, почвенный агар (ПА), картофельная среда для маслянокислых бактерий, среда Гильтая для денитрифицирующих бактерий, среда Виноградского для нитрифицирующих бактерий, среда Гётчинсона для

аэробных целлюлозных бактерий, среда Вильджона для анаэробных целлюлозных бактерий, среда Ван-Дельдена для десульфурирующих бактерий и среда Натансона для тионовокислых бактерий.

Первая серия сред с посевной жидкостью выдерживалась при 0° в течение 34 дней, вторая серия — 2 месяца при 16° и третья — около 3 месяцев при 25°. После этих сроков инкубации производилось обследование посевов.

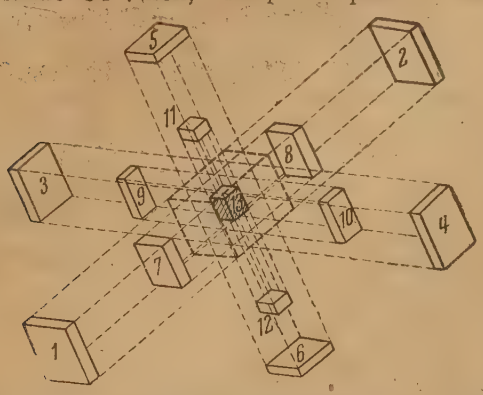

Рис. 4. Схема резки монолита ископаемого льда для получения опытных образцов. Пунктиром изображен монолит до расчленения; *1, 2, 3, 4, 5, 6* — наружные грани монолита; *7, 8, 9, 10, 11, 12* — последующие грани, *13* — ядро монолита

Стерильными оказались среды, содержащие ядро монолита, и внутренние 6 граней. Из 6 наружных 4 дали рост на МПБ, МПА, ПА, картофельной среде, среде Гильтая и на поверхности среды Вильджона. Среди выделенных видов — спороносные и неспороносные палочки, желтый микрококк, актиномицеты и грибы. Нужно отметить, что на МПА количество колоний составляло от 3 до 12.

Полученные результаты свидетельствуют об отсутствии в монолите ископаемого льда микроорганизмов, способных к возобновлению жизнедеятельности после десятков тысяч лет пребывания в замороженном состоянии. Микрофлора наружных частей, по-видимому, внесена во время транспортировки или при взятии монолита.

Необходимо вновь подчеркнуть, что приведенные данные не решают окончательно вопроса о возможности длительного сохранения жизнеспособности микроорганизмов в условиях вечной мерзлоты. Нужны планомерные исследования в большем масштабе, и в особенности погребенных торфяников, микробиологическое изучение которых в связи с глубиной нахождения, а следовательно, их возрастом, может дать суждение о возможных границах во времени выживания микробов при постоянном действии отрицательных температур.

Институт микробиологии
Академии Наук СССР
Москва

Получено 9.III.1944

ЛИТЕРАТУРА

1. Крисс А. Е. О микроорганизмах в вечной мерзлоте. Микробиология, т. IX, вып. 9—10, 879, 1940.
2. Граве Н. А. Ископаемые льды водораздела рек Лены и Алдана. Труды Инст. мерзлотоведения Ак. Наук, т. IV (в печати).

ON ANABIOSIS IN PERMANENTLY FROZEN GROUND A THOUSAND YEARS OLD

A. Kriss and *N. Grave*

Summary

In summer 1940 the authors investigated in Central Jacutia vas accumulations of fossil ice, enclosed in a bed of permanently frozen rocks. The formation of this ice should be correlated with the glaciation

of Siberia, and its age may therefore be reckoned in tens of thousands of years.

A block taken from a depth of 9.5 m was subjected to microbiological examination whose aim it was to determine the presence of bacterial life, resp. of a possible revival of the microorganisms. The work was carried on in a chamber with a controlled temperature ranging between positive temperatures and −25° C.

13 test-specimens were out from the block: 6 outer sections, 6 sections net to these, while the 13-th represented the core of the block. The cutting up was carried out by means of on electric ice-cutter: a thin wire stretched out by springs between two porcelain rollers set upon metallic rods. The rollers were movable along the rods so that the wire which transmitted an electric current and was heated to incandescence cut the ice owing to the weight of the rollers, and at the same time sterilized the faces.

Seeding was on to meat-peptone broth, meat-peptone-agar, soil-agar, and upon media for butyrik acid fermentation, denitrifying, nitrifying, cellulose decomposing, desulphurizing and tio-acid bacteria. One set with seeded media was kept at 0° for 34 days. A second set, at 16°, for two months, and a third at 25°, for three months. Sterile proved to be media containing the core of the block and the internal six faces. Of six outward faces four were found to be non-sterile. Among the isolated species were found sporiferous and non-sporiferous bacilli, yellow micrococci, actinomycetes and fungi.

The results obtained testify to the absence in the block of fossil ice of microorganisms which would be able to resume their life activity after having passed tens of thousands years in a frozen state. The microflore of the external parts seems to have appeared during the transportation or sampling of the block.

Institute of Microbiology of the
Academy of Sciences of the USSR
Moscow

ВИРУСНЫЕ БОЛЕЗНИ РАСТЕНИЙ В КИРГИЗИИ

К. С. Сухов, А. М. Вовк и Т. С. Алексеева

В настоящем обзоре мы даем краткий перечень вирусных, или подозреваемых как вирусные, болезней растений, с которым мы столкнулись во время непродолжительной работы в г. Фрунзе.

Идентификация заболеваний производилась преимущественно по внешним признакам, хотя в некоторых случаях их инфекционность устанавливалась экспериментально. Описание болезней дается по семействам. Там, где это возможно, используется номенклатура из классификации K. Smith [6].

Solanaceae

Вирус табачной мозаики (Nicotiana virus 1, Allard) широко распространен в окрестностях г. Фрунзе. В 1942 г. на табачной плантации филиала Всесоюзного института табака и махорки (ВИТИМ) поражение этим вирусом достигало 70%. Вирус табачной мозаики был также обнаружен на томате (до 100%), на перце (Capsicum annuum L.) (до 50%), и в немногих случаях на баклажане (Solanum melongena L.) (до 0,5%). На перце вирус был идентифицирован по внутриклеточным кристаллам Ивановского и по образованию некрозов на листьях Nicotiana glutinosa.

Кроме обыкновенного штамма, который доминирует, на томате была обнаружена также аукуба мозаика (Nicotiana virus 1 C Bewley). Вирус полосатости или стрик томата был обнаружен лишь в редких случаях. Симптомы болезни были характерны и совпадали с признаками полосатости томата, распространенной в теплицах подмосковных хозяйств. Болезнь выражалась линейным некрозом стебля, развитием угловатых некрозов на листьях и некротизированием плодов.

Вирус кольцевой пятнистости табака встречается часто, и даже молодая рассада оказываеся уже зараженной им. Многие растения из рассады, привезенной из Фрунзе в Москву, проявили признаки кольцевой пятнистости.

Вирус пестрицы в 1942 г. на плантации филиала ВИТИМ достигал значительного распространения. По данным ВИТИМ, в 1938 г. пестрица на табаке была зарегистрирована в 9 районах Фрунзенской области, давая поражение от 0,3% (Караванский район) до 19,9% (Таласский район).

Столбур (Lycopersicum virus 5 Samuel, Bald a. Fardley) в 1942 г. в окрестностях Фрунзе имел незначительное распространение. На территории Фрунзенского ботанического сада встречались лишь единичные больные растения томата. На участке плодоовощной станции поражение томата столбуром местами достигало 4—7%. В 1943 г. поражение столбуром на том же участке возросло до 15%.

На пригородной табачной плантации в 1942 г. столбуром были поражены единичные растения. По данным упомянутого выше обследования, проведенного филиалом ВИТИМ, из девяти обследованных районов только в четырех был обнаружен столбур на табаке, достигающий здесь 0,2—0,5%.

Кроме томата и табака поражение столбуром было отмечено также на перце, баклажане и вьюнке.

Некротическая мозаика картофеля (типа акропетального некроза Quanjer) была распространена на всех бывших под наблюдением посевах картофеля и достигала местами 50% и выше.

Аукуба мозаика картофеля (Solanum virus 9, Murphy and Quanjer), напротив, встречалась лишь на единичных растениях.

Cucurbitaceae

Мозаика огурца (Cucumis virus 1 Doolittle) в окрестностях Фрунзе имеет слабое распространение. Мы нашли лишь несколько экземпляров огурца, пораженных этим вирусом. Сходная мозаика в нескольких случаях была также обнаружена на дыне. На тыкве, при обследовании различных участков, огуречная мозаика не была обнаружена.

В немногих случаях на тыкве был отмечен хлороз листьев, сопровождающийся позеленением цветов. Этиология этого заболевания осталась невыясненной.

Cruciferae

На пригородных посевах дунганской редьки было обнаружено мозаичное заболевание. Болезнь была передана соком и тлей Brevicoryne brassicae. Перенести вирус при помощи тли Myzus persicae не удалось. Начинается болезнь посветлением нервов на молодых листочках. Позже появляется мозаика в виде темного лентовидного окаймления вдоль нервов и широких хлоротичных участков между ними. Иногда мозаика имеет характер разбросанных по листу темнозеленых бугристых участков.

В проходящем свете или, еще лучше, при погружении листа в воду становится заметной пятнистость как на хлоротичных, так и на темноокрашенных участках, состоящая из мелких круглых, светлозеленых пятен. Из-за неравномерного роста тканей листья волнисты, иногда морщинисты. В 1942 г. на посевах дунганской редьки в Фрунзенском ботаническом саду распространение мозаики достигало 14%. Болезнь, вероятно, родственна мозаике китайской редьки (Raphanus sp.), описанной Tompkins в Калифорнии.

На тех же посевах до 10% растений обнаруживало своеобразный симптом нового, не описанного для этого вида заболевания — в виде листовых выростов (enation) и отчленения центральной жилки от пластинки листа.

Развитие листовых выростов происходит на нижней пластинке листа и по своему формообразованию аналогично enation, возникающему в результате действия вируса обыкновенной табачной мозаики на Nicotiana paniculata и Nicotiana tomentosa (Holmes, Jensen), или действию штамма enation вируса табачной мозаики на томат (Ainsworth [5]), или, наконец, случаям ненормальной генетической конституции, описанным Honig у Nicotiana tabacum deformis. У дунганской редьки листовые выросты также имеют анатомическое строение, обратное строению основной пластинки листа, благодаря чему на нижней их стороне развивается не губчатая, а полисадная паренхима. Отчленение главной жилки листа в дистальной части наблюдается довольно часто. Иногда до ⅓ жилки оказывается свободной. Утоньшаясь к концу, свободный участок нерва поднимается кверху. Цилиндр свободного участка несет на всей своей поверхности волоски и заканчивается пучком листочков. На этих же листьях, или на других, не имеющих отчленения жилки, нередко наблюдается разрастание многочисленных листочков по краю основного листа, которые образуют

крупные пучки, идущие по ходу нервов низшего порядка. Свободный выход центральной жилки из пластинки листа описан Рыжковым при мозаике лопуха [2, 3].

Массовое развитие листовых выростов у дунганской редьки по типу enation заставляет подозревать связь этого явления с вирусной инфекцией.

Отмечено мозаичное заболевание на капусте. На молодых листьях наблюдается посветление по ходу нервов и нежная крапчатость, которая постепенно усиливается и на более развитых листьях становится резкой.

Compositae

На территории Фрунзенского ботанического сада на маргаритке — Bellis perennis L.— наблюдалось позеленение цветов, замеченное Никитиной и в предыдущие годы. Части цветов, превратившиеся в более или менее разросшиеся листочки, придают соцветию сходство с головкой клевера, подобно тому как это описано Рыжковым в Башкирии для кок-сагыза и некоторых других сложноцветных. Позеленение цветов у кок-сагыза Рыжков связывает с вирусным заболеванием типа желтухи. Возможно, что наблюдавшееся нами позеленение цветов маргаритки представляет симптом того же заболевания. Несколько случаев позеленения цветов отмечено также на георгине.

Papilionaceae

Мозаика люцерны, отмечена в районе Фрунзе и Канта. Наблюдается три типа мозаики: желтая кольцевая пятнистость, мозаика с курчавостью листьев и легкая мозаика. Первый тип мозаики характеризуется крупными желто-зелеными или желтыми кольцевыми пятнами, часто удлиненными или имеющими концентрическое строение. Отдельные кольца, частично сливаясь, образуют цепочки, тянущиеся от основания листа к его верхушке. Кольца резко выражены на старых листьях, а на молодых имеют нежные, едва заметные очертания.

Мозаика с курчавостью листьев представляет более тяжелый тип заболевания. Больные растения отстают в росте. Листья сильно гофрированы. Их пластинка испещрена множеством мелких светлозеленых пятен, которые под лупой имеют форму концентрических колец. Часть пятен некротизируется. Наблюдается также посветление по ходу нервов. Общий тон окраски листьев значительно более светлый, чем у нормальной люцерны. На посевах Ботанического сада распространение этой мозаики в 1942 г. достигало 15% (на люцерне 3-го года).

Легкая мозаика характеризуется развитием на листовой пластинке светлозеленых секторов. Рост остается нормальным. Листья гладкие.

Являются ли эти типы мозаики различным проявлением одного и того же заболевания или представляют симптомы различных болезней — не установлено.

Судя по внешнему проявлению, можно предположить родственность возбудителя желтой кольцевой пятнистости вирусу обыкновенной мозаики люцерны (Medicago virus 1. Weimer), описанному в Северной Америке.

Недостаточное описание симптомов, вызываемых на люцерне Medicago virus 2(Pierce, Zaumeyer and Wade), затрудняет сравнение с ним, однако нам представляется возможной родственность этого вируса и возбудителя мозаики люцерны со скручиванием листьев.

На белом клевере отмечена мозаика, по рисунку идентичная мозаике, вызываемой Trifolium virus 1 (Pierce).

Зеленая мозаика фасоли неоднократно встречалась нам на посевах, расположенных на различных участках. Вредоносность ее

высокая. Растения сильно отстают в росте, листья скручены. Наиболее ярко мозаика выражена на молодых листьях.

Saxifragaceae

Махровость смородины, передаваемая клещиком Eriophyes ribis, в окрестностях Фрунзе отсутствует. Просмотр свыше тысячи смородинных кустов не обнаружил ни одного махрового растения. Не были также найдены галлообразные клещевые почки.

Malvaceae

В районе плодоовощной станции наблюдались растения Malva sp. с резко проявленной мозаичностью листьев. Рыжков наблюдал мозаику мальвы (Malva borealis) на Украине.

Chenopodiaceae

Обследование в 1942 и 1943 гг. крупных массивов сахарной свеклы в районе Фрунзе и Канта установило полное отсутствие мозаики свеклы.

Graminae

На опытном участке Сельскохозяйственного института и на посевах селекционной станции весной 1943 г. на озимой пшенице было найдено значительное количество мозаичных растений. По внешнему виду это заболевание не могло быть отнесено к закукливанию и, напротив, имело большое сходство с мозаикой озимой пшеницы. Больные растения в результате чрезмерного кущения и подавленного роста представляли собой розетки из многочисленных стебельков. Мозаика на листьях была образована желтовато-зелеными полосками и удлиненными пятнами, идущими параллельно нервам. Исследование мозаичных участков под микроскопом не смогло выявить внутриклеточные включения. Также не удалось получить белковые кристаллы при мацерации мозаичных листьев в 0,1 *N* растворе соляной кислоты, что обычно удается в случае мозаики озимой пшеницы. На основании этого можно считать, что обнаруженное заболевание не является мозаикой озимой пшеницы или закукливанием и, повидимому, представляет собой новое, не описанное еще вирусное заболевание злаков.

Попытки найти закукливание в районе Фрунзе и Канта оказались безрезультатными. Повидимому, этот вирус в Киргизии отсутствует. Его переносчик — темная цикадка — был обнаружен на всходах ячменя, но в очень незначительном количестве.

На кукурузе в редких случаях была отмечена узорчатая мозаика, составленная из многослойных концентрических колец, образующих на листе причудливый рисунок. Листья пораженных растений сильно развивают антоциан и становятся красноватыми. Инфекционность болезни не определялась.

Приведенный нами краткий перечень замеченных вирусных заболеваний растений, конечно, далек от полного списка вирусов, распространенных в Киргизии, однако уже и сейчас там выступает некоторое своеобразие в наборе вирусов.

Так, например, ряд вирусов, широко распространенных в Европейской части Союза или в Сибири — здесь, повидимому, отсутствует. Это относится к вирусу махровости черной смородины, мозаики свеклы, к вирусу закукливания и, возможно, к вирусу мозаики озимой пшеницы.

Изучение географического распространения вирусов, свойственных флоре Союза, находится в самой начальной стадии, поэтому крайне желательно в будущем усилить работу по составлению списков вирус-

ных заболеваний растений в различных республиках и областях Советского Союза.

В настоящее время, насколько нам известно, такие списки имеются лишь для Башкирской АССР (Рыжков) для Западной Сибири (Мурашкинский [1]) и для Грузинской ССР (Эристави [4]).

Институт микробиологии
Академии Наук СССР
Москва

Получено 7.III.1944

ЛИТЕРАТУРА

1. Мурашкинский К. Е. Новые болезни культурных растений в Западной Сибири. Омск, 1935.
2. Рыжков В. Л. Мутації и хвороби хлорофілової зернини. Держ. Мед. Вид. 1935.
3. Рыжков В. Л. Ультравирус и морфогенез у растений. Сб. памяти Тимирязева, 1936.
4. Эристави Е. М Вирусные болезни растений в Грузинской ССР. Тр. вирусн. совещ., Москва, 1941.
5. Ainsworth G. C. «Enation mosaic» of tomato caused by a virus of the tabacco virus 1 type. Ann. Appl. Biol., v. 24, No. 3, 1937.
6. Smith K. M. Textbook of plant virus diseases. 1937.

PLANT VIRUS DISEASES IN KIRGHIZ SSR

K. Sukhov, A. Vovk and *T. Alexeeva*

Summary

In the region of the town Frunze (Kirghiz SSR) the following virus diseases were encountered on cultivated plants: tobacco mosaic (Nicotiana virus 1 Allard, according to Smith's classification) on tobacco, tomato, Capsicum annuum L. and in a few cases, on Solanum melongena L.

Tomato and tobacco were found to be subject to the stolbur disease — big bud (Lycopersicum virus 5 Samuel, Bald and Fardley); on tomato Streak was observed in addition.

Of rather wide occurrence on tobacco is the virus disease «pestriza» which has not been described outside of USSR.

Potato was found to be affected by a disease caused by the *y*-virus, as well as by Solanum virus 9.

Cucumis virus 1 Doolittle was discovered in an insignificant per cent of cases. On Cucurbita pepo L. a chlorotic disease was observed, accompanied by the flowers turning green.

Raphanus sp. was found to be the carrier of a mosaic disease transmitted by the aphis Brevicoryne brassicae; leaf-enation was also observed very frequently.

In Bellis perennis L. there was observed greening of the flowers causing in the affected plants a clover-like appearance of the heads.

Alfalfa was found to carry three types of mosaic disease; as to its symptoms one of them approximates most closely Medicago virus 1 Weimer, while the other approaches Medicago virus 2 Pierce, Zaumeyer and Wade.

Clover was found to carry a mosaic disease whose pattern is identical with that caused by Trifolium virus 1 Pierce.

In the bean there was observed a green mosaic disease accompanied by dwarfishness. Winter wheat was found to be infested with a new disease attended by mosaic and leaf-rosette.

The following virus disease have not been found, in spite of assiduous search: reversion disease of black currant, mosaic disease of beet (Beta virus 2 Lind.); neither could we observe zakuklivanie of grasses and the mosaic of winterwheat, transmitted by Deltocephalus striatus L.

Institute of Microbiology of the
Academy of Sciences of the USSR
Moscow

СОДЕРЖАНИЕ

Н. А. Красильников. Влияние растительного покрова на микробный состав в почве 187

М. В. Федоров. Влияние корневых выделений кукурузы на фиксацию азота атмосферы Azotobacter chroococcum в условиях монобактериальной культуры . . . 199

А. А. Имшенецкий и Н. М. Авдиевич. Рост термофильных актиномицетов 211

Б. Л. Исаченко и А. А. Егорова. Актиномицеты водоемов, как одна из причин землистого запаха воды 216

С. В. Горюнова. Изучение механизма лизиса. I. Сравнительное изучение протекания процессов лизиса и автолиза у Actinomyces штамма Махлина . . 226

М. Р. Гибшман. Изменчивость молочнокислых стрептококков . . 238

А. Е. Крисс и Н. А. Граве. Об анабиозе в вечной мерзлоте тысячелетнего возраста 251

К. С. Сухов, А. М. Вовк и Т. С. Алексеева. Вирусные болезни растений в Киргизии . . 256

CONTENTS

N. Krassilnikov. Microflora of soils as influenced by plants . . . 197

M. Fedorov. Fixation of atmospheric nitrogen by Azotobacter chroococcum under conditions of monobacterial culture, as affected by root secretions in maize 209

A. Imšenecki and N. Avdievich. Growth of thermophilic actinomycetes 215

B. Issatchenko and A. Egorova. Actinomycetes in reservoirs, as one of the causes responsible for the earthy smell of their waters 224

S. Gorjunova. Contribution to the study of the mechanism of lysis . . 237

M. Gibshman. Variability of lactic-acid streptococci 250

A. Kriss and N. Grave. On anabiosis in permanently frozen ground a thousand years old 254

K. Sukhov, A. Vovk and T. Alexeeva. Plant virus diseases in Kirghiz SSR 260

Ответственный редактор *Б. Л. Исаченко*

Подписано к печати 1.IX. 1944 Объем $4^3/_4$ печ. л. $9^1/_2$ уч.-изд. л. А12151
Тираж 2000 экз. Цена 8 руб. Зак. № 1037

18-я типография треста «Полиграфкнига» ОГИЗа при СНК РСФСР,
Москва, Шубинский, 10

Цена 8 руб.